

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Magdaléna Fialová

Komáři jako hostitelé ptačích trypanosom

Mosquitoes as vectors of avian trypanosomes

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.

Školitel specialista: RNDr. Jana Brzoňová, Ph.D

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Poděkování

Touto cestou bych v první řadě chtěla poděkovat doc. Mgr. Mileně Svobodové, Dr., která vedla mé první kroky v laboratoři i terénu a která mi poskytla mnoho rad i času, aby mohla být tato práce dokončena. Chtěla bych dále poděkovat RNDr. Janě Brzoňové, Ph.D, která mne zaškolila v potřebných technikách a Anně Brotánkové, která byla mou spolupracovnicí při terénních odchytech, a tedy i nezbytnou součástí této práce. Poslední děkuji bych ráda věnovala mým rodičům, bez jejichž podpory bych toto poděkování pravděpodobně nepsala a také mým přátelům, kteří nikdy nešetřili slovy plnými podpory. Děkuji.

Abstrakt

Ptačí trypanosomy jsou relativně běžní parazité ptáků, avšak znalosti o jejich přenosu a vektorech jsou stále nedostatečné. Je zde několik čeledí hmyzu, kteří jsou přenašeči těchto parazitů: muchničky (Simuliidae), kloši (Hippoboscidae), komáři (Culicidae), tiplíci (Ceratopogonidae) a flebotomové (Psychodidae). V této diplomové práci byla věnována pozornost komárům. Zkoumána byla prevalence ptačích trypanosom u volně odchycených komárů rodu *Culex*. Dále, z důvodu objasnění životního cyklu, byla věnována pozornost experimentálnímu přenosu vybraných izolátů ptačích trypanosom z komárů na ptáky.

Během sezon 2017 a 2018 byli pomocí CDC pastí odchyťováni komáři na třech lokalitách. Celkem bylo odchyceno 956 (125 poolů) komárů rodu *Culex*. Z celkového počtu bylo na ptačí trypanosomy pozitivních 14,4 %. MIR (Minimal Infection Rate) se během jednotlivých odchytových měsíců (květen-srpen) pohybovala mezi 0 % a 8,3 %. Nejčastěji identifikovaná byla *T. culicavium*, nalezena v 13,6 % (n=17) poolů. Paraziti ze skupiny *T. avium* byli zastoupeni pouze v 0,8 % (n=1), kdy se jednalo o druh *T. thomasbancrofti*.

V experimentální části byla věnována pozornost vývoji *T. thomasbancrofti* a *Trypanosoma* sp. v laboratorních komárech *Cx. quinquefasciatus* a *Cx. molestus* a jejich experimentálnímu přenosu na laboratorní pěvce. Tyto trypanosomy se dobře vyvíjely u obou druhů laboratorních komárů a vytvářely silné infekce. Po perorální inokulaci parazitů se experimentální infekce podařila u ptáků inokulovaných *T. thomasbancrofti*.

V této diplomové práci bylo ukázáno, že prevalence ptačích trypanosom mezi komáry rodu *Culex* je poměrně nízká. Dále se zdařil experimentální cyklus *T. thomasbancrofti*, která byla z experimentálně infikovaných komárů přenesena na laboratorní pěvce. Infekce se vyvinula i u komárů nasátých na infikovaných pěvcích, čímž se potvrdila jejich vektorová role.

Klíčová slova: *Trypanosoma*, prevalence, komár, pták, infekce, životní cyklus

Abstract

Avian trypanosomes are quite common parasites of birds, although knowledge of their life cycles and vectors is still insufficient. There are some insect families which serve as vectors of these parasites: blackflies (Simuliidae), hippoboscids (Hippoboscidae), mosquitoes (Culicidae), biting midges (Ceratopogonidae) and sandflies (Phlebotomidae). In this study we have been focused on mosquitoes. We have examined prevalence of avian trypanosomes at wild-caught mosquitoes from genus *Culex*. Furthermore we have studied experimental transmission of avian trypanosomes from mosquitoes to birds.

Mosquitoes were caught with CDC traps in three different localities during seasons 2017 and 2018. We caught 956 (125 pools) mosquitoes belonging to genus *Culex*, from whom 14,4 % pools were positive for avian trypanosomes. MIR (Minimal Infection Rate) fluctuated between 0 % to 8,3 % in studied months (May-August). The most frequently identified parasite was *T. culicavium*, detected in 13,6% (n=17) pools. Parasites belonging to *T. avium* group were detected only in 0,8 % (n=1), it was *T. thomashancofti*.

In our experimental part we have been focused on development of *T. thomashancofti* and *Trypanosoma* sp. in laboratory bred mosquitoes *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. molestus* and on their experimental transmission to laboratory songbirds (Passeriformes). These trypanosomes were able to develop heavy infections in both species of mosquitoes. After peroral inoculation of mosquitoes guts we managed to infect birds with *T. thomashancofti*.

In this thesis we have shown that prevalence of avian trypanosomes among mosquitoes belonging to genus *Culex* is quite low. Furthermore, we succeeded in experimental life cycle of *T. thomashancofti*, which was transmitted from experimentally infected mosquitoes to birds. The vector role of mosquitoes was proved after the infection was able to develop even in the guts of mosquitoes fed on infected birds.

Key words: *Trypanosoma*, prevalence, bird, mosquitoes, infection, life cycle

Obsah

1	Úvod a cíle práce.....	9
2	Literární přehled	11
2.1	Prevalence a detekce ptačích trypanosom	11
2.2	Faktory ovlivňující prevalenci ptačích trypanosom	12
2.3	Vztahy mezi ptačími trypanosomami	13
2.4	Patogenita ptačích trypanosom	14
2.5	Vývoj trypanosom v ptačím hostiteli	15
2.6	Přenašeči ptačích trypanosom	16
2.7	Způsob přenosu ptačích trypanosom	17
2.8	Charakteristika jednotlivých vektorů	17
2.8.1	Komár (Diptera: Culicidae)	17
2.8.2	Flebotom (Diptera: Psychodidae)	18
2.8.3	Tiplík (Diptera: Ceratopogonidae)	19
2.8.4	Muchnička (Diptera: Simuliidae)	19
2.8.5	Kloš (Diptera: Hippoboscidae)	20
2.9	Ptačí trypanosomy přenášené komáry	21
2.9.1	<i>Trypanosoma culicavium</i>	21
2.9.2	<i>Trypanosoma thomasbancrofti</i>	23
2.10	Prevalence ptačích trypanosom v komárech	23
3	Materiál a metodika	25
3.1	Terénní odchyty komárů	25
3.1.1	Zpracování odchycených komárů	27
3.2	Výpočet MIR	27
3.3	Kultivace trypanosom	27
3.3.1	Média použitá pro kultivaci trypanosom	28

3.3.2	Sklízení kultur trypanosom.....	30
3.3.3	Zmrazování a rozmrazování izolátů	30
3.4	Laboratorní chovy komárů	30
3.5	Infekční sání komárů.....	31
3.5.1	Inaktivace a promývání králíčí krve	31
3.5.2	Membránové sání	31
3.5.3	Stanovení hustoty trypanosom	32
3.5.4	Pitvy samic komárů.....	32
3.6	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii.	33
3.7	Experimentální infekce laboratorních pěvců	33
3.7.1	Xenodiagnostika	34
3.8	Izolace DNA.....	34
3.9	Detekce kinetoplastid	34
3.9.1	Standardní PCR.....	35
3.9.2	Nested PCR	36
3.9.3	Elektroforéza	37
3.9.4	Přečištění, sekvenace a vyhodnocení PCR produktu	38
4	Výsledky.....	39
4.1	Terénní odchyty hmyzu	39
4.1.1	Dynamika komárů rodu <i>Culex</i>	40
4.1.2	Vyšetření komárů rodu <i>Culex</i> na přítomnost ptačích trypanosom ..	42
4.1.3	Prevalence trypanosom po pitvách komárů z Milovického lesa	45
4.2	Infekční sání.....	45
4.2.1	Izolát CUL 15.....	45
4.2.2	Izolát PAS 343	46
4.2.3	Izolát CUL 5	48
4.3	Pokusy s laboratorními pěvci	50

4.3.1	Inokulace pěvců izolátem PAS 343	50
4.3.2	Infekce pěvců izolátem CUL 5	52
5	Diskuse	54
5.1	Sezonní dynamika	54
5.2	Prevalence ptačích trypanosom v komárech rodu <i>Culex</i>	55
5.3	Experimentální infekce laboratorních komárů.....	57
5.4	Experimentální inokulace laboratorních pěvců	59
6	Shrnutí	62
7	Závěr.....	63
8	Literatura.....	64

1 Úvod a cíle práce

Parazité rodu *Trypanosoma* jsou jednobuněční dvouhostitelští prvoci, kteří jsou nalézáni u zástupců téměř všech zvířecích řádů. Jsou navíc odpovědní za nemoci, které ročně postihují mnoho lidí a zvířat (Chagasova choroba, spavá nemoc, nagana a další). Celková biodiverzita a biologie trypanosom je zatím poměrně neprozkoumaná, což platí i pro trypanosomy ptačí, které pro svůj nízký zdravotní a ekonomický dopad bývají ve studiu opomíjeny.

První ptačí trypanosoma byla popsána Danilewskym před více než 130 lety (v Baker, 1976) a od té doby bylo popsáno mnoho dalších druhů. Tyto trypanosomy ovšem byly popisovány na základě nalezení v novém ptačím hostiteli. Takto vysoká specifita se ale neprokázala. Dnes, na základě molekulárních studií, řadíme ptačí trypanosomy do tří skupin reprezentovaných druhy *T. bennetti* (skupina A), sesterskými *T. culicavium* a *T. corvi* (skupina B) a *T. avium* (skupina C) (Zídková a kol., 2012). Do těchto skupin jsou zařazeny izoláty získané z ptačích hostitelů, ale i jejich potenciálních vektorů. Vektory ptačích trypanosom jsou komáři (Culicidae), tiplíci (Ceratopogonidae), muchničky (Simuliidae), kloši (Hippoboscidae) a nově jsou do tohoto výčtu zařazeni i flebotomové (Psychodidae).

Komáři jsou jedni z nejdůležitějších přenašečů lidských a zvířecích patogenů (virů, bakterií, prvoků a filárií), ale ve vztahu k trypanosomám je jejich role poměrně neobjasněna. Prozatím se experimentálně podařilo prokázat, že komáři rodu *Culex* dokáží přenášet *T. culicavium* (Votýpka a kol., 2012). Na základě molekulárních dat je velice pravděpodobné, že přenášejí ještě minimálně další dva druhy trypanosom, a to *T. thomashamiltoni* (skupina C, linie II) a *Trypanosoma* sp. (skupina C, linie III).

Cíle diplomové práce:

- Popsat sezónní dynamiku komárů rodu *Culex* na vybraných lokalitách.
- Určit prevalenci ptačích trypanosom mezi odchycenými komáři rodu *Culex* a pomocí molekulárních metod určit jejich linii.
- Otestovat vnímavost laboratorních komárů *Cx. molestus* a *Cx. quinquefasciatus* pro *T. thomashamiltoni* a *Trypanosoma* sp.

- Určit lokalizaci trypanosom u experimentálně infikovaných komárů a zaznamenat změny lokalizace v čase.
- Ověřit vektorovou kapacitu komárů experimentálním přenosem *T. thomascrofti* a *Trypanosoma* sp. na laboratorní pěvce.

2 Literární přehled

2.1 Prevalence a detekce ptačích trypanosom

Ptačí trypanosomy (*Trypanosoma*, Kinetoplastea: Trypanosomatidae) jsou poměrně běžní krevní parazité ptáků, mající interkontinentální rozšíření. Zjišťováním prevalence ptačích trypanosom mezi hostiteli se zabývalo několik studií, ze kterých je patrné, že prevalence se na různých místech planety liší. Uvádějí zastoupení těchto parazitů u ptáků ve škále od 6 % do 58 % (Kučera, 1983; Kirkpatrick a Suthers, 1988; Rintamäki, 1999; Sehgal a kol., 2001; Zamora-Vilchis a kol., 2012; Oakgrove a kol. 2014; Cooper a kol. 2017).

Důležitou roli u prevalence trypanosom hraje i zvolená metoda jejich detekce. Za nejméně průkazný způsob je považováno mikroskopování obarveného roztěru periferní krve. Infekce ptačími trypanosomami jsou totiž většinou chronické, parazité se tudíž v krvi vyskytují jen v nízkém počtu, a tak možnost jejich zachycení je jen minimální. Výsledky z krevních roztěrů tak mohou vycházet zdánlivě negativně (Diamond a Herman, 1954; Kučera 1982; Kirkpatrick a Suthers, 1988 Svobodová a Votýpka, 1998). O něco pravděpodobnější záchyt parazita je pak při mikroskopování kostní dřeně (Stabler a kol., 1966). Metoda vyvinutá pro zlepšení detekce je pak centrifugace krve v heparinizovaných kapilárách. Trypanosomy je možné najít zkoncentrované ve vrstvě séra nad peletem z červených krvinek (Bennett, 1962; Hamer a kol., 2013). Dnes jsou za nejlepší metody považovány metody kultivační a molekulární. Kultivace periferní krve ptáků na krevním agaru dokáže zachytit parazity daleko pravděpodobněji než roztěry krve (Kučera, 1982; Kirkpatrick a Suthers, 1988; Svobodová a Votýpka, 1998). Ještě lepších výsledků je pak dosahováno při kultivacích kostní dřeně (Diamond a Herman, 1954; Kučera 1983). Při využití molekulárních metod (amplifikace malé ribozomální podjednotky RNA genu neboli SSU rRNA) se podařilo dosahovat lepších výsledků nežli v případě krevních roztěrů (Sehgal a kol., 2001; Sehgal a kol., 2005). Pomocí molekulárních metod (SSU rRNA) lze pozitivitu ptáka určit i z ptačích orgánů (Cooper a kol., 2017), i když se dříve nedařilo parazity v orgánech nalézt mikroskopicky ani kultivačně (Baker, 1956b; Apanius 1991).

2.2 Faktory ovlivňující prevalenci ptačích trypanosom

Kromě metodiky vyšetřování ovlivňují prevalenci i další faktory. Množství parazitů v krvi kolísá například během roku. Kučera (1983) pozoroval snižující se prevalenci trypanosom u volně žijících pěvců při přechodu z hnízdní sezony do podzimu. V zimě pak parazité z periferní krve zcela vymizeli. Ovšem při vyšetření kostní dřeně se ukázalo, že ptáci jsou stále pozitivní a že parazité se z periferní krve pouze stáhli. Stejný průběh byl zaznamenán i u rehků zahradních (*Phoenicurus phoenicurus*) hnízdících ve Finsku. V době hnízdění dosahovala prevalence 58 % a před začátkem migrace klesla na 43 % (Rintamäki, 1999). Deviche a kol. (2001) zaznamenali signifikantně zvýšenou prevalenci trypanosom u samců strnadce zimního (*Junco hyemalis*) na vrcholu hnízdní sezony oproti prevalenci na jejím začátku a konci.

Dalším z ovlivňujících faktorů je i věk hostitele. Už Bennett a Fallis (1960) tvrdí, že u starších ptáku je prevalence parazitů vyšší než u ptáků mladých, protože starší jedinci jsou déle vystaveni působení vektorů. Ke stejnému závěru došel i Kučera (1983) u volně žijících pěvců; Svobodová a Votýpka (1998) a Svobodová a kol. (2015a) u dravců; Deviche a kol. (2001) u strnadců zimních. Naopak Rintamäki a kol. (1999) u rehků zahradních (*Phoenicurus phoenicurus*) ani Valkiunas a kol. (2003) u dlasků tlustozobých (*Coccothraustes coccothraustes*) nezaznamenali signifikantní rozdíly mezi mladšími a staršími jedinci. Prevalence trypanosom u mladých ptáků navíc může souviset s množstvím mlád'at v hnízdě. Prevalence se zvyšuje s vyšším počtem mlád'at v hnízdě. Autoři předpokládají, že je to proto, že pro vektory jsou díky větší biomase atraktivnější hnízda s více mlád'aty (Svobodová a kol., 2015a).

Riziko infekce souvisí i s místem, kde se pták nejčastěji vyskytuje, tedy kde hnízdí a obstarává si potravu. Ptáci pohybující se po zemi nebo blízko u ní budou více ohroženi parazity přenášenými komáry *Cx. pipiens*. Naopak ptáci žijící ve vyšších výškách, jako jsou například dravci, budou více ohroženi parazity, pro něž slouží jako vektor muchničky (Černý a kol., 2011). Snižující se množství infikovaných jedinců byla navíc zaznamenána i u ptáků žijících a hnízdících ve vyšších nadmořských výškách, kde nižší teplota neprospívá vývoji parazitů v přenašečích (Zamora-Vilchis a kol., 2012; Gonzáles a kol., 2014).

2.3 Vztahy mezi ptačími trypanosomami

První popis ptačí trypanosomy pochází od Danilewského (1885, v Baker 1976), který popsal tohoto prvoka z krve puštíka obecného (*Strix aluco*) a pojmenoval ho *T. avium*. Od té doby bylo popsáno zhruba 100 dalších druhů trypanosom. Tyto druhy ale zřejmě nejsou validní, protože jejich popis je založený na základě nálezů parazitů v novém ptačím druhu či na jejich morfologii. Experimenty však ukazují, že jednotlivé druhy ptačích trypanosom nejsou striktně specifické a mohou se vyskytovat u ptáků různých druhů (Baker, 1956a; Bennett, 1961; Sehgal a kol., 2001; Votýpka a kol., 2004; Zídková a kol., 2012). Baker (1976) předpokládá, že celosvětově je mezi ptáky rozšířeno maximálně 12 odlišných druhů trypanosom.

Sehgal a kol. (2001) se zabývali trypanosomami z krve západoafrických ptáků. Na základě morfologie z krevních roztěrů dokázali rozlišit dvě trypanosomy, *T. avium* a *T. everetti*. Následně podrobili vzorky amplifikaci malé podjednotky rRNA genu (SSU rRNA), která ukázala odlišnost těchto dvou morfotypů, navíc ale odhalila 7 různých haplotypů u vzorků *T. avium*. Haplotypy I-VI se na základě SSU rRNA nejvíce podobaly *T. bennetti* z americké poštolky pestré (*Falco sparverius*), kdežto haplotyp VII odpovídal *T. avium* získané z havrana (*Corvus frugilegus*) z Čech. Autoři vyslovili hypotézu, že skupina *T. avium* vykazuje značnou genetickou variabilitu a že morfologická kritéria tuto skutečnost nedokáží rozlišit.

Existenci minimálně dvou skupin ptačích trypanosom se na základě molekulárních dat podařilo dokázat Votýpkovi a kol. (2002, 2004). Zídková a kol. (2012) rozčlenili ptačí trypanosomy do tří skupin. Do této studie bylo zařazeno mnoho izolátů od různých skupin ptáků i od předpokládaných hmyzích vektorů. Skupina A je reprezentována *T. bennetti* a spadaly do ní izoláty pouze od ptáků (pěvců i dravců). Až později byl potenciálním vektorem pro tuto skupinu označen tiplík (Ceratopogonidae, Svobodová a kol., 2017). Skupina B obsahuje dva sesterské druhy trypanosom. První z nich je linie *T. culicavium*, která obsahuje izoláty z lejsků bělokrkých (*Ficedula albicollis*) a komárů *Cx. pipiens*. Druhá je pak utvářena izoláty *T. corvi* z kloše a káněte (*Buteo buteo*). Největší skupina C je reprezentována *T. avium* a izoláty z ptáků (pěvci, dravci), komárů (Culicidae), muchniček (Simuliidae), kloše (Hippoboscidae) a flebotoma (Psychodidae) (Zídková a kol., 2012).

V dnešní době se tedy místo morfologických používají molekulární metody, ale ukázalo se, že ptačí trypanosomy lze rozlišit i podle kinetoplastu. Kinetoplast je

organela, která je součástí mitochondrie a která dala za vznik názvu Kinetoplastea. Skládá se ze složité sítě kinetoplastové DNA rozlišující se na maxikroužky a minikroužky (Lukeš a kol., 2002). U ptačích trypanosom se ukázalo, že jejich kinetoplasty se liší velikostí kDNA minikroužků a i celkovou strukturou kinetoplastu. (Yurchenko a kol., 1999; Lukeš a Votýpka, 2000). Velikost a tvar kinetoplastu se shodují například u izolátu *T. avium* z dravců a z muchniček, tedy z hostitelů a vektorů těchto trypanosom. Na fotografiích z elektronového mikroskopu měly tyto kinetoplasty cylindrický tvar, na rozdíl od kinetoplastů trypanosom z ostatního hmyzu (klošů, komárů a tiplíků), které byly podlouhlé a užší (Votýpka a kol., 2002). Existenci dvou skupin kinetoplastů ukázala i následná analýza kDNA minikroužků. Votýpka a kol. (2004) dokázali na základě kinetoplastu rozlišit druh *T. avium* od *T. corvi*. Kinetoplast trypanosomy *T. corvi* z havrana polního (*Corvus frugilegus*) se navíc v tvaru a velikosti kDNA shodoval s kinetoplastem trypanosomy pocházející z kloše (Votýpka a kol., 2002), který byl za přenašeče *T. corvi* označen (Baker, 1956a). Zídková a kol. (2012) pak rozdělili trypanosomy do dvou skupin s kinetoplastem užším než 500 nm (skupina *T. bennetti* a *T. culicavium/T. corvi*) a širším než 500 nm (skupina *T. avium*). Toto dělení je ovšem dosti hrubé.

2.4 Patogenita ptačích trypanosom

Ve většině případů nepůsobí trypanosomy žádné patologické změny v ptačím hostiteli, což je jeden z důvodů, proč bývají ve studiu opomíjeny. Thiroux (1905, v Molyneux 1983) ale popisuje úhyny rýžovníků šedých (*Padda oryzivora*) v důsledku velice vysoké parazitémie. Molyneux a kol. (1983) popisují ptáky po experimentální infekci trypanosomami (jimi pojmenovány jako *T. bouffardi*), jimž vysoká parazitémie způsobila zvětšení sleziny a záněty srdce. Zvětšení sleziny u experimentálně inokulovaného kanára si všiml i Baker (1956b), který ale přiznává, že by za tuto patologii mohlo být zodpovědné *Plasmodium*, které u kanára objevil v koinfekci s trypanosomou. David a Nair (1955) popisují paralýzu nohou u některých ptáků inokulovaných vysokou dávkou parazitů.

Trypanosomy mohou být zodpovědné i za ovlivnění pohlavního výběru. U čížků žlutých (*Spinus tristis*) bylo pozorováno zesvětlení zbarvení u jedinců pozitivních na trypanosomy (Lumpkin a kol., 2014). To by podle hypotézy Hamiltona a Zukové (1982) mohlo hrát zásadní roli při výběru partnera, protože samice si vybírají samce tmavěji zbarvené, tedy takové, kteří nevykazují přítomnost parazitů.

2.5 Vývoj trypanosom v ptačím hostiteli

Ačkoli jsou ptačí trypanosomy běžní krevní parazité ptáků, je jen málo informací o jejich vývoji v těle ptačích hostitelů. Poté, co se pták nakazí metacyklickými trypomastigoty z přenašeče, objeví se trypanosomy v periferní krvi ptačího hostitele. Prepatentní perioda před nálezem parazitů v krvi se liší. Například Baker (1956b) popisuje trypanosomy v krvi kanárů (*Serinus canaria*) inokulovaných *T. avium* už po 18 hodinách. Svobodová a Rádřová (2018) naproti tomu ukazují, že infekce u kanárů inokulovaných *T. avium* mohou být detekované i až po 21 dnech od experimentální inokulace. Parazitémie trypanosom v krvi se postupně snižuje a přechází do fáze chronické, kdy se parazité stahují do kostní dřeně, kde pravděpodobně přečkávají zimní měsíce (Baker 1956b; Kučera 1983). Baker (1956b) popisuje *T. corvi* u kanárů, které tímto parazitem inokuloval. Nejprve nacházel parazity v cévách lymfatického systému, poté v krevním oběhu. Detekce těchto parazitů byla možná pouze do dvou měsíců od inokulace, poté už nebylo možné parazity nalézt v periferní krvi ani v kostní dřeni. Na rozdíl od kanárů u havranů, coby častých hostitelů *T. corvi*, infekce přetrvávala déle, a to od podzimu do následného jara. Dělicí se stádia trypanosom nebyla u žádného z ptáku nalezena. Bennett (1970) pozoroval hladinu parazitémie u experimentálně nakažených rýžovníků šedých (*Padda oryzivora*) inokulem *T. avium* z komárů *Ae. aegypti*. U těchto ptáků mohl pozorovat fluktuaci parazitů v krvi, kde nejsilnější parazitémie byla ihned po inokulaci, následně se snižovala až do 31. dne od inokulace. V těchto zhruba třiceti denních cyklech fluktovala infekce u rýžovníků po dobu 400 dní. Bennett předpokládal, že by to mohlo značit cyklické dělení parazitů. Hypotéza o dělení trypanosom v ptačím hostiteli je podpořena i zdařilým přenosem infekce mezi ptáky inokulací krve získané z infikovaného ptáka, do ptáka neinfikovaného (Chatterjee a Ray, 1971).

Několik autorů se pokoušelo dělicí se trypomastigoty v ptácích nalézt. Thioroux (1905, v Baker 1976) popisuje dělení trypomastigotů, kteří jsou ovšem přítomni jen při velice silných infekcích. Ovšem neilustroval žádná stádia cytokineze, ale pouze parazity, kteří měli zdvojený kinetoplast, bičík a jádro. Woodcock (1910, v Baker 1976) popisuje malá stádia trypanosom z kostní dřeně, kteří mají zdvojený bičík. Demaree a Marquardt (1971) popisují stádia parazitů se zdvojenými kinetoplasty, jádry a bičíky z krve experimentálně inokulovaných kanárů. Domnívají se ale, že tyto trypomastigoti se zdvojenými orgány byli

zastavení v procesu morfogeneze, vyvolané přenosem z kultury do ptáka. Tento náznak dělení označili za nepravý a předpokládali, že se v ptákovi žádné pravé dělení neodehrává.

Ačkoliv většina autorů předpokládá, že k potenciálnímu dělení parazitů dochází v kostní dřeni, Molyneux (1973) popisuje dělení trypomastigotů *T. bouffardi* v periferní krvi. Toto dělení bylo ovšem možné zpozorovat jen na roztěrech vytvořených 15. den od inokulace, později už nikoli. Chatterjee a Ray (1971) našli dělicí se stádia v roztěrech z periferní krve a kostní dřeni.

2.6 Přenašeči ptačích trypanosom

Stejně jako u trypanosom savčích, tak i mezi ptáky přenáší tyto parazity několik čeledí krev sajících členovců. Dnes jsou za pravděpodobné přenašeče ptačích trypanosom označovány muchničky (Simuliidae, Bennett, 1961, Votýpka a kol., 2002; Votýpka a Svobodová 2004), kloši (Hippoboscidae, Baker 1956a; Votýpka a kol., 2004), komáři (Culicidae, Baker, 1976; Votýpka a kol., 2012), tiplíci (Ceratopogonidae, Miltgen a Landau, 1982; Svobodová a kol., 2017) a flebotomové (Psychodidae, Kato a kol. 2011; Svobodová a Rádrová, 2018). Parazité se vyvíjejí ve střevech vektorů, která jsou tvořena ze tří hlavních částí - přední (foregut), střední (midgut) a zadní (hindgut) střevo. Za specifického vektora by měl být považován jen takový, ve kterém se trypanosomy udrží i po strávení krve. V nestrávené krvi totiž mohou přežívat i trypanosomy, které nejsou schopny v přenašeči vytvořit infekční stádia a po prasknutí peritrofické matrix jsou vyloučeny společně se zbytky potravy (Votýpka a kol., 2012). Toto ovšem neplatí pro kloše, kteří žijí na svém hostiteli stále a ve střevě je vždy krev přítomna.

Na rozdíl od nízké specifity ptačích trypanosom vůči ptákům je u hmyzu pozorována specifita větší (Apanius, 1991). Například *T. avium* je běžně přenášena muchničkami, ale dokáže se uchytit i ve flebotomech (Kato a kol., 2011; Svobodová a Rádrová, 2018). I tiplíci *Culicoides nubeculosus* jsou pro *T. avium* velice vnímaví (Svobodová a kol., 2017). Na druhou stranu *T. culicavium* se vyvíjela pouze v komárech *Cx. quinquefasciatus*, ale v tiplících se vyvíjet nedokázala (Votýpka a kol., 2012; Svobodová a kol., 2017). *T. bennetti* zase nedokázala infikovat flebotomy či komáry *Cx. quinquefasciatus* a *Ae. aegypti*, pouze tiplíky *C. nubeculosus* (Svobodová a kol., 2017; Svobodová a Rádrová, 2018). Zdá se tedy, že vektorová specifita utváří specifitu trypanosom uvnitř ptačích komunit. Důležité je sledovat také potravní preference hmyzu a jejich lokality výskytu na

kterých se s nimi může potkat potencionální ptačí hostitel (Apanius, 1991; Černý a kol., 2011).

2.7 Způsob přenosu ptačích trypanosom

Zatím se podařilo potvrdit různé způsoby přenosu trypanosom z hmyzích vektorů do ptačího hostitele. Prvním je pozřením infikovaného vektora, kdy se trypanosomy vyskytují v zadní části střeva vektora (Votýpka a Svobodová, 2004). Tímto způsobem je překvapivě přenášena i *T. culicavium*, která se u infikovaných komárů vyskytuje na stomodeální valvě (Votýpka a kol., 2012). Druhým možným způsobem je přenos trypanosom přes narušenou pokožku či oční spojivku, kdy mohou být metacyklická stadia kinetoplastid obsažena v moči vylučované během sání (Sádlová a kol., 1998; Sádlová a Volf 1999). Přenos přes spojivku byl dokázán u muchniček přenášející *T. avium* (Votýpka a Svobodová, 2004).

2.8 Charakteristika jednotlivých vektorů

V následujících kapitolách se budu zabývat charakteristikou jednotlivých vektorů ptačích trypanosom. Zvláštní pozornost je pak věnována komárům, konkrétně trypanosomám, které mezi ptáky přenáší. V následujícím výčtu jsou nejdříve uváděni dlouhoroží (Nematocera), a následně krátkoroží (Brachycera) dvoukřídlí.

2.8.1 Komár (Diptera: Culicidae)

Komár je běžným trapičem a přenašečem nejrůznějších patogenů (virů, bakterií, prvoků, filárií), nicméně ve spojení s trypanosomami je jeho role vektora poměrně neprozkoumaná. Jednou z trypanosom, o které víme, že je přenášena komáry je žabí *T. rotatorium* (Mayer 1843 v Desser a kol., 1973), mezi vektory ptačích trypanosom byl však komár zařazen mnohem později. Několik kinetoplastid nacházejících se u komárů navíc patří mezi jednohostitelské parazity, jako například *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, a *Paratrypanosoma* (Wallace, 1943; Flegontov a kol., 2013)

Už Schaudinn (1904, v Baker, 1976) pozoroval dělení epimastigotů v hřbetu a midgutů komárů *Culex pipiens* poté, co sáli na trypanosomami infikovaném sýčkovci obecném (*Athene noctua*). Navíc se domníval, že trypanosomy penetrují do ovárií a že by se mohly přenášet transovariálně na potomky. Je ale pravděpodobné, že tyto trypanosomy byly ve skutečnosti spermie, jelikož od té doby nikdo takovouto lokalizaci nepozoroval (Baker, 1976). David a Nair (1955) pozorovali vyvíjející se infekci u komárů

Cx. fatigans nasátých na infikovaných vrabcích domácích (*Passer domesticus*). Primární lokalizace parazitů byla v midgut, kde docházelo i k prvnímu dělení. Následně migrovali do zadního střeva a z něj do předního, odkud v podobě metacyklických trypomastigotů migrovali do slinných žláz. Přenos trypanosom na ptáky při komářím sání se ale nezdařil. Komár byl tedy označen za nepravděpodobného přirozeného vektora ptačích trypanosom (Nair a David, 1956). I Bennett (1961) označil komáry za nepravděpodobné přenašeče i přesto, že se infekce dobře vyvíjela u komárů *Aedes aegypti*, kteří se nasáli na infikovaném sýcovi americkém (*Aegolius acadicus*). Infekci se mu totiž podařilo na další ptáky přenést pouze intraperitoneální a perorální inokulací metacyklických stádií. Při krmení ptáků celými infekčními vektory se přenos nezdařil. Bennet (1970) dále pokračoval v pokusech s komáry *Ae. aegypti*. Pozoroval masivní zmnožení parazitů v midgut, ještě v době, kdy byla ve střevě vytvořena peritrofická membrána. Po prasknutí membrány většina bičíkovců opustila střevo se zbytky potravy, ale některým se podařilo uchytit v hindgut. Tato stadia v hindgut zůstávala i po opětovném sání komára. Vzhledem k vysokému obsahu bičíkovců ve výkalech po prasknutí peritrofické membrány předpokládal, že jsou tyto trypanosomy přenášeny přes narušenou pokožku.

Chatterjee (1977) pozoroval vývoj trypanosom ve střevě komárů *Ae. aegypti* po sání na infikovaných holubech. Bezprostředně po sání byly trypanosomy přítomny jen v malých počtech, ale už po 2 hodinách začaly měnit svůj tvar a po 4 hodinách se začaly rapidně množit. Epimastigotní stadia se objevovala jak v hindgut, tak v midgut a bylo je možné nalézt i ve výkalech. Chatterjee testoval také různé způsoby přenosu trypanosom. U ptáků dokázal vyvolat infekci po intramuskulárním a po intraperitoneálním vpichu částí komářích střev s metacyklickými stádii, po perorální inokulaci, i po jejich umístění na narušenou pokožku. Po krmení ptáka celými vektory nebo po nanesení na neporušenou pokožku k infekcím nedocházelo.

2.8.2 Flebotom (Diptera: Psychodidae)

Flebotomové jsou známí jako přenašeči parazitů rodu *Leishmania*, ale jsou i potenciální ptačích trypanosom (Kato a kol., 2011; Svobodová a Rádrová, 2018). Při experimentálním membránovém sání s *T. avium* se ukázalo, že *Lutzomyia longipalpis* a *Phlebotomus arabicus* jsou pro tuto trypanosomu velice vnímaví (66 a 89 % prevalence). Trypanosomy byly lokalizovány především v hindgut, v několika málo případech byly zaznamenány i v abdominálním midgut a v malpighických trubicích. U všech ptáků perorálně

inokulovaných suspenzí infikovaných střev byly nalezeny trypanosomy v periferní krvi, a to už první den od experimentální inokulace (Svobodová a Rádrová, 2018).

To, že tito parazité by v přírodě mohli sloužit jako přenašeči ptačích trypanosom potvrzuje i fakt, že se z volně žijících a vydefekovaných flebotomů rodu *Lutzomyia* podařilo vyizolovat *T. avium* (Kato a kol. 2011).

2.8.3 Tiplík (Diptera: Ceratopogonidae)

Už Bennett (1961) se zabýval tiplíky coby možnými vektory ptačích trypanosom a zkoumal jejich vývoj v amerických druzích (*Culicoides sphagnumensis*, *C. stilobezzioides* a *C. crepuscularia*). Trypanosomy se ve střevě objevovaly jen dokud nebyla nasátá krev strávena. Nezůstávaly zachyceny na stěně střeva, ale odcházely s výkaly pryč. I přes to, parazité ze střeva tiplíků byli po intraperitoneální inokulaci rýžovníka šedého po 24 hodinách detekovatelní v jeho krvi. Těsně po infekci a prvním odběru krve pták uhynul, takže nebylo možné vývoj infekce pozorovat dále. Bennett (1961) se domníval, že tiplík by v přírodě mohl sloužit jako vektor ptačích trypanosom, ale jen velice vzácně.

Miltgen a Landau (1982) nechali na papouškovi alexandr švestkový (*Psittacula roseata*) infikovaném trypanosomou (jimi nazvanou *T. bakeri*) nasát laboratorně chované tiplíky *Culicoides nubeculosus*. Infekce se u nich vyvíjela velice dobře a byla detekovatelná i pátý den po infekčním sání. Po perorálním podání infikovaných tiplíků papouškům, byla po 11 dnech detekovatelná přítomnost parazitů v periferní krvi. Tito autoři naopak tiplíky za vektory ptačích trypanosom v přírodě považovali.

Tiplíci byli potvrzeni jako vektoři *T. bennetti*, pro kterou se dlouho nedařilo najít přirozeného přenašeče v přírodě (Zídková a kol., 2012). Po membránovém sání se tato trypanosoma dobře vyvíjela ve střevech *C. nubeculosus*. Infekce ptáků se však povedla jen po intraperitoneálním podání parazitů laboratorním pěvcům. *T. bennetti* se navíc podařilo nalézt u 4 tiplíků druhu *C. alazanicus*, *C. pictipennis*, *C. clastrieri* a *C. festivipennis* z 1184 jedinců odchycených ve volné přírodě. Na druhou stranu, *T. avium*, která se ve stejném pokusu u tiplíku také velice dobře vyvíjela, byla infekční pro ptáky po perorálním podání suspenze infikovaných střev (Svobodová a kol., 2017).

2.8.4 Muchnička (Diptera: Simuliidae)

Muchničkami jakožto potenciálními vektory ptačích trypanosom se v minulosti zabývalo více studií. Už Bennett (1961) popisoval trypanosomy ve střevech muchniček, které

nechal nasát na infikovaných ptácích. Tyto trypanosomy se vyvíjely v hindgutu i po defekaci krve, ale bylo možné je nalézt i ve vydefekovaných zbytcích potravy. Vyvolat infekci u ptáků se mu podařilo intraperitoneálním vpichem parazitů, a i jejich umístěním na narušenou pokožku. Po nakapání na oční spojivku či na nenarušenou pokožku se přenos nepovedl. Další, komu se podařilo dosáhnout experimentální infekce u ptáků intraperitoneálním vpichem, tentokrát suspenzí muchniček infikovaných *T. numidae*, byl Fallis a kol. (1973).

Způsob přenosu pozřením infekčního vektora dokázali demonstrovat až Desser a kol. (1975), kteří našli trypanosomy v krvi kachen (*Anas moschata*) experimentálně krmených muchničkami *Simulium rugglesi*, infikovanými *T. avium*. O tento způsob přenosu infekce se pokoušel již dříve Bennett (1961). Jemu se ale nepovedlo infekce u ptáků dosáhnout, a proto předpokládal, že před samotným spolknutím musí být vektor rozmělněn, aby se metacyklická stádia dostala ven ze střeva (Bennett, 1961).

Votýpka a kol. (2002) nejdříve molekulárně potvrdili výskyt trypanosomy *T. avium* jak mezi dravci, tak mezi muchničkami. Následně Fotýpka a Svobodová (2004) dokázali *T. avium* přenést na laboratorní pěvce, a to po perorálním podání infikovaných střev z muchniček ptákům, ale také přes oční spojivku. Emulze ze zadní části střeva pozitivních muchniček *Eusimulium latipes* (přejmenována na *Simulium venum*) byla nakapána na oční spojivku kanárů (*Serinus kanaria*) a kachen (*Anas platyrhynchos f. domestica*). U kachen se infekce nevyvinula, zatímco u všech kanárů ano. Je to pravděpodobně zcela první důkaz možnosti přenosu přes oční spojivku u ptačích trypanosom. Ptáky se pokoušeli nakazit i trypanosomami z kultur, ale bezúspěšně (Fotýpka a Svobodová, 2004).

2.8.5 Kloš (Diptera: Hippoboscidae)

Baker (1956a) popisoval vývoj trypanosom pocházejících z havrana polního (*Corvus frugilegus*) v kloši (*Ornithomyia avicularia*). Tato trypanosoma byla původně popisována jako *T. avium*, ale později byla přejmenována na *T. corvi* (Baker, 1976). Baker (1956a) pozoroval po sání ve střevě kloše trypomastigoty měnící se v dlouhé epimastigoty v midgutu. Epimastigoti se následně dělili a měnili se v menší epimastigotní stádia, migrující do hindgutu, kde se po přichycení bičíky ke stěně střeva dále dělili a postupně se přetvářeli na metacyklická stádia. Mungomba a kol. (1989) popisují, že většina parazitů *T. corvi* je v době trávení krve v ektoperitrofickém prostoru v midgutu. Trypanosomy byly

orientované bičíky k mikrovilli a některé dokonce penetrovaly do střevních buněk. V zadním střevě byla většina parazitů přichycená ke stěně, ale v menším počtu byla pozorována i volná, pravděpodobně metacyklická stádia.

Při snaze objasnit životní cyklus *T. corvi* se Baker (1956b) snažil co nejvíce napodobit přírodní podmínky, když zavřel do speciálně připravené krabice neinfikovaného havrana a vypustil k němu infikované kloše *O. avicularia*. Pravidelně byly havranovi odebírány vzorky krve, které se ukázaly být pozitivní. Po ukončení pokusu Baker pochytil zbylé kloše. Jelikož jich bylo méně než na začátku pokusu, předpokládal, že havran nějaké kloše sezobl a že přenos bude tedy pozřením infikovaného vektora. Tento přenos se povedlo demonstrovat i u drozda brávníka (*Turdus viscivorus*), který pozřel celé nakažené kloše, dále také u kanárů, kterým byla suspenze z infikovaných částí střeva a fyziologického roztoku podána perorálně (Baker, 1956b)

Na druhou stranu Bennett (1961) pozoroval jen jedinkrát vývoj trypanosom v kloši *O. fringillina* nasátém na infikovaném strnadci bělohrdlém (*Zonotrichia albicollis*). Tato stádia ze střeva kloše vpravil do jiného strnada. Po sání klošů na experimentálně infikovaném strnadovi se v žádném z dvanácti *O. fringillina* nepodařilo trypanosomy nalézt, tedy až na dobu, kdy byla ve střevě ještě nestrávená krev z infikovaných ptáků. Proto se Bennett (1961) domníval, že v místě jeho výzkumu nehrají kloši roli přenašeče.

2.9 Ptačí trypanosomy přenášené komáry

V dnešní době se na základě molekulárních dat předpokládá, že komár slouží jako přenašeč tří ptačích trypanosom. Jsou jimi *T. culicavium*, u které se přenos již podařilo experimentálně prokázat (Votýpka a kol., 2012) a dále dvě trypanosomy ze skupiny *T. avium* linie II a III (Zídková a kol., 2012). V linii II je jí *T. thomasbancrofti* (Šlapeta a kol., 2016) a v linii III zatím blíže nepopsána *Trypanosoma* sp., která na základě nalezení v komárech i ptácích je pravděpodobně další trypanosomou, v jejímž životním cyklu hraje komár roli přenašeče (Zídková a kol., 2012; Cooper a kol., 2017).

2.9.1 *Trypanosoma culicavium*

Trypanosoma culicavium představuje první a zatím jedinou trypanosomu, u níž se podařilo experimentálně potvrdit, že jejím vektorem je komár (Votýpka a kol., 2012). Tato trypanosoma byla na základě sekvenace SSU rRNA zařazena do skupiny B, kde tvoří sesterskou skupinu k *T. corvi* (Zídková a kol., 2012; Votýpka a kol., 2012).

T. culicavium byla vyizolována ze stomodeální valvy komára *Culex* (*Culex*) *pipiens*. Následně byla nalezena i u *Culex* (*Barraudius*) *modestus*, což dokazuje, že se v přírodě dokáže vyvíjet minimálně ve dvou poddruzích komára rodu *Culex* (Votýpka a kol., 2012). Nicméně několikanásobně vyšší prevalence této trypanosomy v druhu *Cx. pipiens* svědčí o tom, že je tento komár častějším přenašečem v přírodě (Votýpka a kol., 2012; Svobodová a kol., 2015b)

K průkazu vnímavosti komárů pro *T. culicavium* byli v experimentech membránového sání využiti komáři *Cx. quinquefasciatus* a *Ae. aegypti* z laboratorních chovů. Komáři *Cx. quinquefasciatus* se ukázali jako dobrý laboratorní model, jelikož po experimentálním membránovém sání a pitvě dosahovala prevalence trypanosom až 85 %. U *Ae. aegypti* dosahovala prevalence pouhých 2 %, což svědčí o tom, že mohou být infikováni i komáři nepatřící do rodu *Culex*, ale jejich vnímavost pro *T. culicavium* je jen minimální (Votýpka a kol., 2012). U tiplíku se infekce nepodařilo dosáhnout vůbec (Svobodová a kol., 2017). Stejně jako u komárů odchycených ve volné přírodě, tak i při experimentálních pokusech se parazité nacházeli na stomodeální valvě, kam migrují po primárním výskytu v midgut. Finální lokalizace na stomodeální valvě je shodná s lokalizací leishmanií ve střevě flebotomů, proto se předpokládalo, že budou mít i shodný přenos, který je spojen s destrukcí stomodeální valvy parazity a jejich následnou regurgitací do rány během sání (Volf a kol., 2004). Nicméně tento způsob přenosu se u *T. culicavium* ukázal jako neúčinný, když se u ptáků nevyvinula infekce poté, co na nich infikovaný vektor sál. Trypanosomy nebyly nalezeny ani v krvi použité pro membránové sání infikovaných komárů ani při použití Hertigova aparátu (Hertig a McConnell 1963), nebily v krvi nalezeny žádné regurgitované trypanosomy. Neúčinná byla i experimentální inokulace kanárů (*Serinus canaria*) stádiu trypanosom z kultury. Přenos byl úspěšný jedině po perorální inokulaci kanárů experimentálně infikovanými komáři. Infekce byly potvrzeny pomocí xenodiagnózy, kdy u nasátých samic komárů byly parazité po pitvě nacházeni opět na stomodeální valvě s prevalencí obdobnou té po membránovém sání (Votýpka a kol., 2012).

Experimentální způsob přenosu *T. culicavium* pozřením infekčního komára napovídá, že ptačím hostitelem budou ve volné přírodě hmyzožraví ptáci, jako například lejsek bělokrký (*Ficedula albicollis*), který se ve volné přírodě živí mimo jiné komáři (Hudec a Šťastný, 2005). *T. culicavium* byla z jeho krve následně vyizolována (Szabová, 2008;

Votýpka a kol., 2012). Dále byla *T. culicavium* nalezena i v Austrálii, a to konkrétně u medonosky zpěvné (*Gavialis virescens*), flétnáka australského (*Cracticus tibicen*) a kruhoočka stříbrného (*Zosterops lateralis*) (Cooper a kol., 2017)

2.9.2 *Trypanosoma thomashancrofti*

Trypanosoma thomashancrofti byla vyizolována a popsána z krve medonosek žlutočerných (*Anthochaera phrygia*), pěvců žijících v Austrálii, živících se hmyzem a nektarem (Šlapeta a kol. 2016).

Už dříve byla na základě SSU rRNA *T. thomashancrofti* zařazena do skupiny C, linie II, jakož i další dva izoláty s vysoce podobnou (99,57 %) sekvencí SSU rRNA. Konkrétně izoláty z komára *Culex pipiens* a budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*) získané v Česku (Zídková a kol., 2012). Na základě této blízké shody byl komár označen jako pravděpodobný přenašeč *T. thomashancrofti*. Navíc díky shodě izolátů z Austrálie a Česka bylo konstatováno, že tato trypanosoma má interkontinentální rozšíření (Šlapeta a kol. 2016). Vývoj ve vektorech ani způsob přenosu však nebyl zkoumán.

2.10 Prevalence ptačích trypanosom v komárech

Povědomost o prevalenci ptačích trypanosom je zatím poměrně malá. I přes nezbytnou roli vektora v biologii ptačích trypanosom není prozatím mnoho studií, které se touto problematikou zabývají. Svobodová a kol. (2015b) mikroskopicky vyšetřovali komáry, muchničky a kloše jakožto potenciální vektory ptačích trypanosom. Prevalence trypanosom se pohybovala mezi 4 až 8 %, ale u muchniček *S. vernum* dosahovala až 60 %. U komárů byla nalézána *T. culicavium*, *T. avium*, ale i jednohostitelská trypanosomatida. Prevalence trypanosom u *Cx. pipiens* dosahovala 5,4 %, u *Cx. modestus* pak 1,4 %. Van Dyken a kol. (2006) se zabývali prevalencí trypanosom mezi komáry rodu *Culex*. Z 69 poolů komárů *Cx. pipiens* bylo na přítomnost ptačích trypanosom pozitivních 11,6 %. Z 143 poolů komárů *Cx. tarsalis* bylo pak pozitivních 20,3 %. Ale mnoho ze sekvencí, které údajně pocházely z nových druhů ptačích trypanosom, bylo později označeno jako jednohostitelská kinetoplastida *Paratrypanosoma confusum* (Flegontov a kol., 2013).

O něco větší pozornost byla věnována komářím přenašečům. Votýpka a kol. (2012) testovali na přítomnost ptačích trypanosom 129 poolů reprezentovaných 2490 jedinci komárů druhu *Cx. pipiens*, 3034 jedinci *Cx. modestus* a 41 jedinci *Cx. torrentium*. *T. culicavium* byla nalezena v 7 poolech z celkového počtu, stanovená MIR

(Minimal Infection Rate) pro *Cx. pipiens* byla 0,3 % a pro *Cx. modestus* 0,05 %. Mezi komáry *Cx. torrentium* nebyl žádný z poolů pozitivní. Ve východním Rakousku pak podrobili nested PCR 1680 poolů komárů o celkovém počtu 29 975 komárů. Nejčastější nalézanou trypanosomou byla savčí *Trypanosoma theileri/cervi*. Ptačí trypanosomy *T. culicavium* a *T. avium* byly nalezeny pouze u komárů rodu *Culex*. Z počtu 325 poolů (2114 jedinců) komárů náležící k rodu *Culex* byly trypanosomy nalezeny ve 25 poolech (7,7 %), kdy v 12 případech šlo o *T. culicavium*, v jednom případě o *T. avium*, ve 3 případech o jednohostitelská trypanosomatida a 10 poolů vykazovalo smíšené infekce. MIR mezi komáry rodu *Culex* dosahovala 1,2 %. Byla ovšem stanovena pro všechny druhy parazitů v pozitivních poolech společně (Schoener a kol., 2018). Další studie se zaměřila na komáry *Culex* odchycené nedaleko Vídně. Tito komáři byli zkoumáni mikroskopicky i pomocí PCR. Celkový počet zkoumaných jedinců byl 316. *T. culicavium* byla nalezena ve 3 poolech, *T. avium* ve 4 poolech a v jednom případě se jednalo o jednohostitelská trypanosomatida, dva z pozitivních poolů se nepodařilo zařadit (Schoener a kol., 2019). Skutečná prevalence se ovšem z uvedených výsledků nedá poznat, jelikož MIR není uvedena.

3 Materiál a metodika

3.1 Terénní odchyty komárů

Komáři byli v terénu odchyťováni pomocí CDC (Centers for Disease Control od firmy John W. Hock) pastí bez světelného zdroje (obr. 3. 1), kde jako atraktant sloužil CO₂ z odpařujícího se suchého ledu umístěného v termosce (o objemu 1,4 l) s hadičkou (o vnitřním průměru 1,2 cm) uvolňující CO₂ přímo k ústí pasti. Komáři byli nasáti skrz větráček a zůstali zachyceni v síťce natažené na kovové konstrukci. Pasti byly instalovány na vytipovaných lokalitách standardně v odpoledních hodinách mezi 16. a 18. hodinou do výšky cca 1-1,5 metru nad zem. Sbírány byly druhý den mezi 8. a 10. hodinou ráno. Na každé lokalitě bylo během jednoho odchyty rozmístěno vždy šest pastí na místa totožná napříč sezonami.

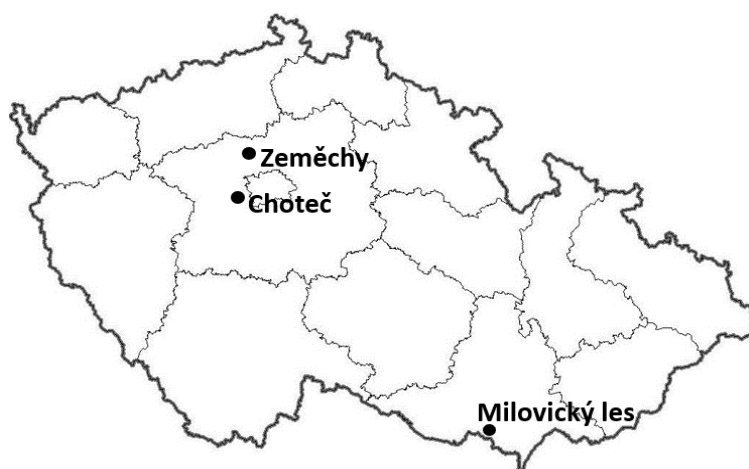


Obr. 3. 1 CDC past instalované pro odchyty krevsajícího hmyzu (zdroj MF).

Terénní odchyty probíhaly na třech odlišných lokalitách (Obr. 3. 2):

- Choteč u Prahy – nejsušší oblast charakteristická sukcesními keři typu trnka obecná (*Prunus spinosa*), bez (*Sambucus* sp.), špendlíky (*Prunus domestica* ssp.) apod. (obr. 3. 3 A). Nejbližší zdroj vod je Radotínský potok vzdálený cca 1 km.
- Zeměchy u Kralup nad Vltavou – v této oblasti je dominantní rostlinou rákos (*Phragmites*) a protéká zde Knovízský potok, který lokalitě dodává vlhčí ráz (obr. 3. 3 B).

- Milovický les u Mikulova – pro tuto oblast jsou charakteristické dubové lesy, obklopené loukami a napajedly pro zvěř, která je zde hojně chována. Samotný les je poměrně suchý, v širším okolí se nachází řada vodních nádrží (obr. 3. 3 C).



Obr. 3. 2 Odchyťové lokality (mapa převzata a upravena z www.mapaceskerekrepubliky.cz)

Odchyty na všech lokalitách probíhaly vždy jednou měsíčně v období od května do srpna. Práce v terénu jsem se účastnila v roce 2018, 2019 (výsledky roku 2019 nejsou v DP zahrnuty). Zároveň jsem laboratorně zpracovávala terénní vzorky z roku 2017.

V červnu 2018 a 2019 (výsledky z roku 2019 nejsou v DP zahrnuty) proběhl navíc intenzivní sběr hmyzu, kdy po dobu pěti dnů probíhaly odchyty v oblasti Milovického lesa a nedaleko Křivého jezera v blízkosti Milovic. Odchycení komáři byli použiti k pitvám a případné tvorbě kultur trypanosom z pozitivních střev komárů. Zbytek komárů byl roztríděn do poolů a zkoumán na přítomnost kinetoplastid pomocí PCR.



Obr. 3. 3 snímky ukazující charakter jednotlivých lokalit: A-Choteč u Prahy, B-Zeměchy u Kralup nad Vltavou, C-Milovický les (foto zdroj MF).

3.1.1 Zpracování odchycených komárů

Komáři z lokalit Choteč a Zeměchy byli převezeni na katedru parazitologie, kde byli cca 15 minut ponecháni v mrazáku při -80 °C. Po usmrcení byli pod stereolupou rozděleni podle druhů do poolu maximálně po 10 jedincích dle lokality a data odchyty. Nasáté samice byly tříděny samostatně, aby nemohlo dojít k falešně pozitivním výsledkům, kdy by byli parazité přítomni v nasáté krvi, ale k jejich následnému vývoji v komárovi by nedošlo. K identifikaci druhů byl použit klíč Fauna ČSR (Kramář, 1958). Zařazení komáři byli až do následného zpracování uloženi v -20 °C. Stejně tak bylo nakládáno i s hmyzem odchytávaným v Milovickém lese s tím rozdílem, že hmyz byl usmrcen v Mikulově pomocí suchého ledu. Do laboratoře byl následně převezen v Petriho miskách na suchém ledu k určení a dalšímu zpracování.

Komáři z mimořádných odchytů v Milovickém lese byli určeni do druhů a následně vypitváni. Střeva byla zkontrolována pod mikroskopem. Pozitivní střeva byla pomocí pitvacích pomůcek rozdělena na dvě části. První část byla uchována v ethanolu či elučním pufru pro pozdější zpracování kinetoplastid pomocí PCR. Druhá část střeva byla pomocí inzulinové injekční stříkačky přenesena do 4 ml sterilních PEN zkumavek s krevním agarem a kultivačním médiem.

3.2 Výpočet MIR

Pro vyhodnocení skutečné prevalence byla vypočítána hodnota MIR (Minimum Infection Rate), kdy bylo bráno v potaz, že v pozitivním poolu byl pouze jediný z komárů pozitivní. Výpočet MIR byl prováděn dle následujícího vzorce:

$$MIR (\%) = \frac{n(PCR \text{ pozitivních poolů})}{n \text{ (celkový počet zkoumaných komárů } Culex)} \times 100$$

3.3 Kultivace trypanosom

Trypanosomy byly kultivovány na dvousložkovém médiu. Jako pevná část sloužil šikmý krevní agar a jako kapalná složka médium R+S, RPMI či overlay. Krevní agar byl připraven do PEN zkumavek, používaných pro terénní odchty a kultivace krve laboratorních pěvců, či byl rozplněn do plochých kultivačních zkumavek („flat tubes“). Standardní dvousložkové medium v kultivačních zkumavkách s plochým dnem, nejčastěji využívaných pro kultivaci, obsahovalo 1 ml krevního agaru a 1-1,5 ml tekutého média.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 23 °C. Jednou týdně byly kultury kontrolovány pod inverzním mikroskopem. Kultury pěstované ve zkumavkách s šikmým dnem byly prohlíženy pod inverzním mikroskopem skrz stěnu zkumavky. Z kultur pěstovaných v PEN zkumavkách byla injekční stříkačkou odebrána kapka media, která byla přenesena na podložní sklíčko a následně prohlížena pod inverzním mikroskopem. Čisté kultury buněk byly přeočkovány do média a po namnožení byly sklizeny a zamrazeny v tekutém dusíku. Kultury, které byly po dobu 3 týdnů bez nálezu parazitů, byly prohlášeny za negativní.

3.3.1 Média použitá pro kultivaci trypanosom

Medium SNB-9

SNB-9 medium je dvousložkové krevní médium. Je složeno z pevné báze a tekuté fáze overlay (tab. 3. 1).

Tab. 3. 1 Složení pevné a tekuté složky media SNB-9

Složky	Pevná báze	Overlay
Neopepton	2 g	2 g
NaCl	0,6 g	0,6 g
Agar	2 g	
Destilovaná H ₂ O	Dolít do 100 ml	Dolít do 100 ml
Defibrinovaná krev	25 ml	

Při tvorbě pevné báze se jednotlivé složky odváží na laboratorních vahách. Namíchaná směs byla ponechána v autoklávu ve 120 °C po dobu 25 minut. Po vyndání se nechala zchladnout na teplotu cca 40 °C a následně bylo v laminárním flowboxu přidáno 25 ml defibrinované králičí krve. Za občasného promíchání byla směs rozplněna po 0,5-0,7 ml do PEN zkumavek a po 1 ml do kultivačních zkumavek s šikmým dnem. Vše bylo uzavřeno, ponecháno ztuhnout v šikmé poloze a skladováno v lednici.

Pro přípravu tekutého overlay byly smíchány složky a následně byly ponechány 25 minut při 120 °C v autoklávu. Po vychladnutí bylo médium uchovááno v chladu v lednici. Overlay je výživově velice chudé kultivační medium, v diplomové práci bylo využíváno jen zcela minimálně.

Tekuté médium R+S

Toto médium je nutričně bohatší a bylo použito pro kultivaci kultur rozmražených z kryobanky. U dobře rostoucích kmenů bylo používáno samostatně, ale většinou se kombinovalo s pevnou složkou v podobě krevního agaru. Po sterilním smíchání veškerých složek (tab. 3. 2) bylo medium uskladněno v lednici.

Tab. 3. 2 Složení tekutého media R+S

Médium RPMI-1640	44 ml
Schneiderovo Drosophila medium	44 ml
FCS (Inaktivované bovinní fetální sérum)	10 objemových procent
Sterilní moč	2 ml
Amikacin	50-100 µl/ml

Izolační medium

Toto médium obsahuje větší množství antibiotik a fungicid (5-Fluorocytosin), proto bylo využíváno při práci s materiálem z terénních odchytů. Po smíchání veškerých složek (tab. 3. 3) ve sterilním prostředí bylo medium uchováváno v lednici.

Tab. 3. 3 Složení izolačního media R+S

Médium RPMI-1640	39 ml
Grace's insect medium	39 ml
FCS (Inaktivované bovinní fetální sérum)	20 objemových procent
Sterilní moč	2 ml
Penicilin	5000 U/ml
Amikacin	100 µl/ml
5-Fluorocytosin	1,5 mg/ml

Pro přípravu izolačního média byly nejprve smíchány RPMI medium (R) a Grace's insect medium (G). Dále byl navážen fluorocytosin a následně rozpuštěn v 15 ml R+G média. Rozpuštěný fluorocytosin byl smíchán s FCS, sterilní močí a antibiotiky a nakonec byla přimíchána zbylá směs R+G media.

3.3.2 Sklizení kultur trypanosom

Kultury napěstované do požadované hustoty byly jednorázovou pipetou přeneseny do 1,5 ml plastových zkumavek. Vše bylo stočeno ve stolní centrifuze mini spin při rychlosti 6000 RPM. Supernatant byl opatrně odlit a následně byly buňky třikrát promyty fyziologickým roztokem. Čisté pelety trypanosom byly uloženy v -20 °C. Takto byly zpracovány buňky získané kultivací infikovaných střev komárů získaných při mimořádných pitvách v Milovickém lese a také napěstované buňky z odebrané krve experimentálně inokulovaných laboratorních pěvců.

3.3.3 Zmrazování a rozmrazování izolátů

Napěstované kultury trypanosom byly přemístěny do sterilních zkumavek. Ke kultuře přidána kryoprezervační látka DMSO v množství odpovídajícímu 5-10 % objemu kultury. Vzniklá směs byla rozplněna do zamrazovacích ampulí po cca 0,5 ml. Tyto ampule byly popsány a minimálně 24 hodin ponechány ve speciálních nádobách při teplotě -80 °C, následně byly uloženy do dusíku.

Při vymrazování preparátů byly ampule odděleny do nádoby s tekutým dusíkem. V pokojové teplotě bylo následně povoleno víčko každé ampulky, aby mohl unikat dusík, který se dostal dovnitř, pro zmenšení rizika roztříštění zmrazovacích ampulí. Po tomto procesu byly ampule přemístěny do vody o teplotě cca 37 °C tak, aby se rychleji roztál zmrzlý obsah. Obsah ampule byl poté přenesen do předem připravených zkumavek s médiem.

3.4 Laboratorní chovy komárů

Součástí mé práce v laboratoři byla i péče o chovy laboratorních komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* a *Cx. pipiens molestus*, používaných v pokusech.

Kolonie komárů jsou drženy při teplotě 26 °C a 60% vlhkosti v sítích natažených na kovové konstrukce. V síti je jim každý týden třikrát jako zdroj potravy poskytnut 50% roztok sacharózy napuštěný do vaty položený na malé skleněné Petriho misce. Jako zdroj krve pro dospělé samice slouží uspané laboratorní myši BALB/c, které jsou zvlášť chovány jen pro tento účel a obě kolonie komárů mají vlastní laboratorní hostitele. Sání je prováděno obvykle jednou týdně. Nasáté samičky mají v síti připravenou nádobu s vodou, kam se mohou vyklást. Vajíčka jsou pak sbírána a přendávána do lavorů, kde probíhá i další vývoj komára až do kukly. Tato nedospělá stádia jsou udržována v odstáté

vodě a krmena potravou pro akvarijní rybičky (Tetramin). Kukly jsou z lavorů vybírány a v nádobě s vodou (překrytou tak, aby tam samice v síti nekladly vajíčka) vkládány zpět do kolonií, kde dokončují svůj vývoj a vylétují.

Veškeré nástroje používané k chovu jsou pro obě kolonie oddělené tak, aby nedošlo k případné kontaminaci, přenosu infekcí, či náhodnému křížení kolonií.

3.5 Infekční sání komárů

Experimentální nákaza komárů byla prováděna s vlastními izoláty trypanosom-CUL 15, PAS343, CUL5 (tab. 3. 4). Pro experimentální infekci byla použita metoda membránového sání.

Tab. 3. 4 Seznam použitých izolátů při experimentálních infekcích komárů. (HG-midgut, AMG, TMG-abdominální a thorakální midgut, SV-stomodeální valva)

Označení	Hostitel	Lokalita	Rok	Lokalizace v komárovi	Zařazení	GenBank číslo
CUL 15	<i>Cx. pipiens</i>	Praha	2000	HG	<i>T. thomashancrofti</i> (Zídková a kol.,2012)	JN00G830
PAS 343	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	Mikulov	2016		<i>T. thomashancrofti</i> (Olga Dolnik, nepublikované)	
CUL 5	<i>Cx. pipiens</i>	Milovický les	2000	AMG, TMG, SV	<i>Trypanosoma</i> spp. C, III (Zídková a kol., 2012)	JN006838

3.5.1 Inaktivace a promývání králičí krve

Králičí krev v požadovaném objemu (obvykle 2-3 ml) byla 10 minut stočena v centrifuze při rychlosti 2500 RPM, tím bylo od erytrocytů odděleno sérum v podobě supernatantu. Sérum bylo odděleno a vloženo na 30 minut do vodní lázně o teplotě 56 °C z důvodu inaktivace komplementu. Zbylé erytrocyty byly mezitím 3x promyty fyziologickým roztokem, kdy se po každém promytí stáčely v centrifuze (10 min/2500 RPM). Po třiceti minutách bylo deaktivované sérum smícháno s promytými erytrocyty.

3.5.2 Membránové sání

Napěstovaná kultura trypanosom byla zkontrolována pod inverzním mikroskopem, zda je dostatečně narostlá a neobsahuje kontaminaci. Část kultury pro stanovení hustoty trypanosom (viz kapitola 3.5.3) byla odebrána do eppendorf mikrozkuřavky, zbytek

kultury byl stočen 10 minut v centrifuze (Thermo scientific, Megafuge 8R) při rychlosti 4100 RPM. Ve zkumavce se po stočení usadil pelet tvořený z buněk trypanosom, supernatant nad ním byl opatrně odebrán a pelet byl smíchán s inaktivovanou krví v požadované hustotě buněk. Takto připravená směs byla tenkou plastovou pipetou přenesena do skleněného krmítka, na kterém byla z jedné strany připevněna sterilní kůžička z kuřete kura domácího (*Gallus domesticus*). Kůžičky byly před pokusem připraveny z mrtvých, zhruba 3 dny starých kuřat, která byla zbavena per a byla jim stáhnuta kůže z celé plochy zad. Tato kůže byla třikrát omyta ethanolem a fyziologickým roztokem a skladována v Petriho misce v -20 °C. Připravené krmítko s krví smíchanou s parazity bylo připevněno do stojanu a nechala se jím proudit voda o teplotě 37 °C tak aby krev zahřívala. Na krmítko se připevnila síťka s komáry, kterým byl den předem odebrán zdroj cukru. Komáři byli minimálně hodinu ponecháni ve tmě s volným přístupem ke krmítku. Z komárů byly po ukončení pokusu vytrženy nasáté samice, které byly ponechány v inkubátoru při 21 °C až do pitvy. Stejně jako v kolonii se i těmito komáři třikrát týdně měnil zdroj cukru. Navíc byly sítě s komáry vloženy do igelitového pytle s kusem navlhčené vaty, pro zajištění dostatečné vlhkosti.

Po dokončení pokusu byla odebrána část krve z krmítka pomocí inzulinové injekční stříkačky. Tato krev byla přenesena na podložní sklíčko a kontrolována pod světelným mikroskopem na přítomnost trypanosom, pro ověření odstranění komplementu z krve.

3.5.3 Stanovení hustoty trypanosom

Hustota trypanosom v kultuře byla počítána za využití Bürkerovy komůrky po stonásobném ředění. Z části kultury odebrané do eppendorf mikro zkumavky bylo pipetou přeneseno 10 μ l a následně smícháno s 990 μ l ředícího roztoku. Ze vzniklého roztoku se vždy 10 μ l přeneslo pod krycí sklíčko z obou stran komůrky. Následně byly počítány trypanosomy v pěti velkých čtvercích na obou stranách komůrky. Celkový počet zaznamenaných buněk se vynásobil ředěním a následně celým objemem napěstované kultury. Tímto způsobem byla zjištěna koncentrace a celkový počet buněk.

3.5.4 Pitvy samic komárů

Nasáté samice byly pitvány nejméně 10 dní po membránovém sání. Samice byly přefoukány do kelímku a imobilizovány na ledu. Pitva probíhala za pomoci pitvacích nástrojů pod stereolupou v kapce fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Střevo bylo vytaženo za poslední zadečkové články po oddělení hlavičky od těla. Následně bylo

přeneseno do čisté kapky fyziologického roztoku a pozorováno pod světelným mikroskopem.

U infikovaných střev byla zaznamenávána intenzita a lokalizace infekce. Jako slabá infekce (+) se hodnotila střeva s cca 1-100 parazity, střední infekce (++) s 100-1000 parazity a silná infekce (+++) s 1000 a více parazity.

3.6 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii.

Silně pozitivní střeva byla pod stereolupou narušena pomocí inzulinové stříkačky. Následně byla vložena do mikrozkušavky s 2,5 % glutaraldehydem a byla ponechána 24 hodin v chladu. Další zpracování obstarávala Laboratoř elektronové mikroskopie PřF UK. V konečné fázi byla připravená střeva přenesena na terčík, pozlacena a focena ve skenovacím elektronovém mikroskopu (JEOL 6380 LV).

3.7 Experimentální infekce laboratorních pěvců

Před samotným zahájením pokusu byla pěvcům odebrána krev. Tato krev byla kultivována pro potvrzení, že ptáci do pokusu vstupují bez předešlé infekce.

Jako zdroj pro inokulaci pěvců sloužila střeva získaná z vypitvaných samic komárů po membránovém sání s izoláty trypanosom PAS 343 a CUL 5. Tato pozitivní střeva byla pod stereolupou narušena inzulinovou injekční stříkačkou a přenesena v 10 ml fyziologického roztoku. Pomocí pipety byla laboratorním kanárům (*Serinus canaria*) a zebříčkám (*Taeniopygia guttata*) nakapána infikovaná střeva perorálně do zobáku. Infekční dávka při jedné inokulaci se pohybovala od 6 do 10 střev. Pro případné infekce byla kanárům odebírána krev a prováděla se xenodiagnostika.

Krev byla ptákům odebírána z povrchové žilky na noze. Noha byla před odběrem desinfikována ethanolem, následně se udělal vpich do žilky a vytékající krev se odebrala do inzulinové injekční stříkačky, ve které bylo nataženo cca 150 µl izolačního média. Medium bylo vstříknuto do PEN zkumavek s krevním agarem a kultivovalo se v 23 °C. Po samotné inokulaci ptáků, byl první odběr krve proveden vždy do 24 hodin od inokulace. Další odběry probíhaly vždy týden po odběru předešlém. Kultury se kontrolovaly po dobu tří týdnů.

3.7.1 Xenodiagnostika

Xenodiagnostika byla v diplomové práci používána u inokulovaných ptáků pro případné potvrzení životního cyklu a potvrzení vektorové role komárů. Pták byl vložen do speciální klecové konstrukce a v ní do sítě s komáry. Komárům bylo umožněno sát na ptácích po dobu jedné hodiny. Po 10 či více dnech byla z nasátých komárů vypitvána střeva a zkontrolována pod mikroskopem. Pakliže bylo střevo pozitivní, byla určena intenzita a lokalizace infekce. Pro potvrzení, že se u komárů jedná o totožnou trypanosomu jako u ptáků, byla vždy alespoň u jednoho pozitivní střeva prováděna kontrola pomocí PCR.

3.8 Izolace DNA

Chemikálie

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- Isopropanol (Top-Bio)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- Ethanol

DNA izolace byla prováděna pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). DNA byla izolována jak z jednotlivých komářích střev s parazity, která byla získána v terénu či při xenodiagnostice, tak pro pooly komárů z terénních odchytů. Střeva získaná v terénu byla uložena a zamražena v lihu v -20 °C či lyzačním pufru. Láh bylo před samotnou izolací nutné nechat odpařit v třepacím bločku při teplotě 37 °C. Komáři roztrženi dle druhu v poolech byli před izolací homogenizováni plastovým pístem v 200 µl elučního pufru a dále izolace probíhala podle návodu výrobce. Nakonec byla DNA eluována do 100 µl elučního pufru a uchována v -20 °C.

3.9 Detekce kinetoplastid

Chemikálie

- Vyizolovaná DNA
- Primery
- EmeraldAmpGT PCR Master Mix (TaKaRa)
- PCR H₂O (TaKaRa)

U vzorků získaných z kultury trypanosom, kdy dosahoval vzorek vysoké koncentrace DNA kinetoplastid, byla použita pouze jednokroková PCR. V případě amplifikace u vzorků

z jednotlivých střev, či pozitivní ptačí krve, kde hustota DNA parazita byla velice nízká, a nebo u detekce z poolů komárů bylo nutno využít citlivější metodu, a to nested PCR.

Při provádění pokusu byla vždy za každým desátým vzorkem přidána pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola byla složena z amplifikační směsi a DNA leishmanií. Negativní kontrola se skládala pouze z amplifikační směsi bez přidané DNA.

3.9.1 Standardní PCR

Amplifikace genu pro malou podjednotku genu SSU rDNA byla u napěstovaných kultur kinetoplastid prováděna pomocí dvojice primerů MedlinA (MedA) a MedlinB (MedB) (Medlin a kol., 1988) viz tab. 3. 5. Složení reakční směsi a teplotní cyklus pro primery MedA a MedB viz tab. 3. 6 a tab. 3. 7.

Tab. 3. 5 Přehled použitých primerů pro standardní PCR

Primer	Gen	Orientace primeru	Sekvence primeru
MedA	SSU rDNA	forward	CTGGTTGATCCTGCCAG
MedB		reverse	TGATCCTTCTGCAGGTCCACCTAC

Tab. 3. 6 Složení reakční směsi standardní PCR

Jednotlivé složky	Množství
Emerald Master Mix	11 µl
PCR H ₂ O	11 µl
Primer MedA	0,5 µl
Primer MedB	0,5 µl
DNA	1 µl

Tab. 3. 7 Teplotní cyklus pro primery MedA a MedB

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	94 °C	5 min
30x	94 °C	1 min
	55 °C	1,5 min
	72 °C	1,5 min
1x	72 °C	5 min

3.9.2 Nested PCR

Při nested PCR byly pro amplifikaci SSU rDNA využity dva páry primerů. Produkt první reakce, za využití vnějších primerů (S762 a S763) (Maslov a kol., 1996), byl použit jako templát pro druhou PCR reakci s vnitřními primery (TRn-F2 a TRn-R2) (tab. 3. 8) (Votýpka a kol., 2015). Složení reakčních směsí pro první a druhý krok nested PCR jsou uvedeny v tab. 3. 9 a tab. 3. 11. Teplotní cykly pro jednotlivé kroky jsou poté uvedeny v tab. 3. 10 a tab. 3. 12.

Tab. 3. 8 Přehled použitých primerů při nested PCR

Primer	Gen	Krok	Orientace primeru	Sekvence primeru
S762	SSU rDNA	1	reverse	GACTTTTGCTTCCTCTAWTG
S763		1	forward	CATATGCTTGTTTCAAGGAC
TRn-F2		2	reverse	GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA
TRn-R2		2	forward	CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT

Tab. 3. 9 Reakční směs prvního kroku nested PCR

Jednotlivé složky	Množství
Emerald Master Mix	7 µl
PCR H ₂ O	7 µl
S762	0,5 µl
S763	0,5 µl
DNA	1 µl

Tab. 3. 10 Teplotní cyklus prvního kroku nested PCR

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	94 °C	5 min
30x	94 °C	1 min
	55 °C	1,5 min
	72 °C	1,5 min
1x	72 °C	5 min

Tab. 3. 11 Reakční směs druhého kroku nested PCR

Jednotlivé složky	Množství
Emerald Master Mix	11 µl
PCR H ₂ O	11 µl
TRn-F ₂	0,5 µl
TRn-R ₂	0,5 µl
PCR produkt	1 µl

Tab. 3. 12 Teplotní cyklus druhého kroku nested PCR

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	94 °C	5 min
30x	94 °C	1 min
	64 °C	1,5 min
	72 °C	1,5 min
1x	72 °C	5 min

3.9.3 Elektroforéza

Chemikálie

- Agaróza (Sigma Co.)
- TAE pufr (Thermo Scientific)
- SybrSafe DNA gel stain (Thermo Scientific)
- GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder Plus (BioLabs, Fermentas)
- Produkt PCR

Pro zobrazení amplifikovaného PCR produktu byla použita horizontální elektroforéza (OWL) s 1% agarózovým gelem. Pro vizualizaci DNA byl přimíchán SybrSafe DNA gel stain (1µl SybrSafe na 1 ml gelu). Jako marker byl použit GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder Plus, který sloužil pro určení velikosti PCR produktu. Na elektroforézu bylo použito 10 µl PCR produktu. Po proběhlé elektroforéze byl gel vizualizován pod UV světlem. Pozitivní vzorky byly dále přečištěny a zpracovány pro sekvenační reakci.

3.9.4 Přečištění, sekvenace a vyhodnocení PCR produktu

Chemikálie

- ExoSAP (Thermo Scientific)
- PCR H₂O
- Primer 1000 R

K samotnému přečištění pozitivního produktu byl používán enzymatický roztok ExoSAP. Přečištění pomocí ExoSAPu je možné v jednom kroku. Na ledu ve flowboxu bylo smícháno 5 µl produktu a 1 µl ExoSAPu. Takto připraná směs byla vložena do termocycleru (tab 3. 13). Poté bylo 1-2,5 µl (dle koncentrace PCR produktu) vzorku smícháno s 1,5 µl primeru 1000 R (ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT) a doplněno do 8 µl PCR H₂O. Takto připravený vzorek byl poslán do Laboratoře sekvenace DNA (Biocev), kde byla sekvenace provedena.

Tab. 3. 13 Program ExoSAP v termocycleru

Počet opakování	Teplota	Délka cyklu
1x	37°C	4 min
1x	80°C	1 min
1x	4°C	Do vyndání vzorku

Získané sekvence byly prohlíženy v programu Bioedit. Pro zařazení jednotlivých sekvencí byl využíván algoritmus BLAST a nukleotidová databáze NCBI na stránce <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

4 Výsledky

4.1 Terénní odchyty hmyzu

V roce 2017 a 2018 probíhaly od května do srpna odchyty hmyzu na třech různých lokalitách (Choteč u Prahy, Zeměchy u Kralup na Vltavou a Milovický les u Mikulova). Výjimku tvoří červen 2017, kdy v Zěmechách odchyt neproběhl z důvodu nepřízně počasí. Komáři z června 2017 museli být vyřazeni z důvodů havárie mrazáku a následnému zplesnivění vzorku, čímž bylo znemožněno komáry určit. Mimo pravidelných odchytů proběhl ještě týdenní odchyt komárů v červenci roku 2018. Během obou dvou sezón byly do CDC pasti chyceni komáři *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Ae. annulipes*, *Ae. cinereus*, *Ae. excrucians*, *Ae. punctor*, *Ae. vexans*, *An. claviger*, *Mansonia richiardi* v sezoně 2018 byli navíc odchyceni *Ae. cataphylla*, *Ae. communis*, *An. maculipennis*, *An. plumbeus* a *Cs. annulata* (viz tab. 4. 1). Během obou sezón byla u komárů rodu *Culex* nejvíce nacházena *T. culicavium*, naproti tomu u komárů rodu *Aedes* byla nejvíce zastoupena *T. theileri*. Dále byla detekována jednohostitelská trypanosomatida.

Tab. 4. 1 Seznam druhů odchycených komárů na jednotlivých lokalitách v sezonách roku 2017 a 2018. Komáry zařazené jako *Ae. sp.* nebylo možné pod stereolupou blíže určit.

Lokalita	Druh	Počet 2017	Počet 2018
Choteč	<i>Cx. pipiens</i>	86	177
	<i>Ae. punctor</i>	0	1
	<i>Ae. sp</i>	12	2
	<i>Ae. ochlerotatus</i>	0	1
	<i>Ae. stiticus</i>	1	0
	<i>Ae. vexans</i>	3	0
	<i>An. maculipennis</i>	0	1
	<i>Cs. Annulata</i>	0	1
Zeměchy	<i>Cx. pipiens</i>	31	107
	<i>Cx. modestus</i>	1	1
	<i>Ae. cantans</i>	15	44
	<i>Ae. cinereus</i>	15	52
	<i>Ae. excrucians</i>	1	12
	<i>Ae. ochlerotatus</i>	0	18
	<i>Ae. punctor</i>	1	1
	<i>Ae. sp</i>	4	22
	<i>Ae. vexans</i>	5	6
	<i>An. claviger</i>	1	18
	<i>M. richiardi</i>	13	0

Milovický les	<i>Cx. pipiens</i>	30	519
	<i>Cx. modestus</i>	0	4
	<i>Ae. caspius</i>	0	18
	<i>Ae. cataphyla</i>	0	1
	<i>Ae. punctor</i>	2	0
	<i>Ae. sp</i>	4	11
	<i>Ae. vexans</i>	22	33
	<i>An. maculipennis</i>	0	8
	<i>An. plumbeus</i>	1	4
	<i>Cs. annulata</i>	9	15
	<i>M. richiardi</i>	72	68

4.1.1 Dynamika komárů rodu *Culex*

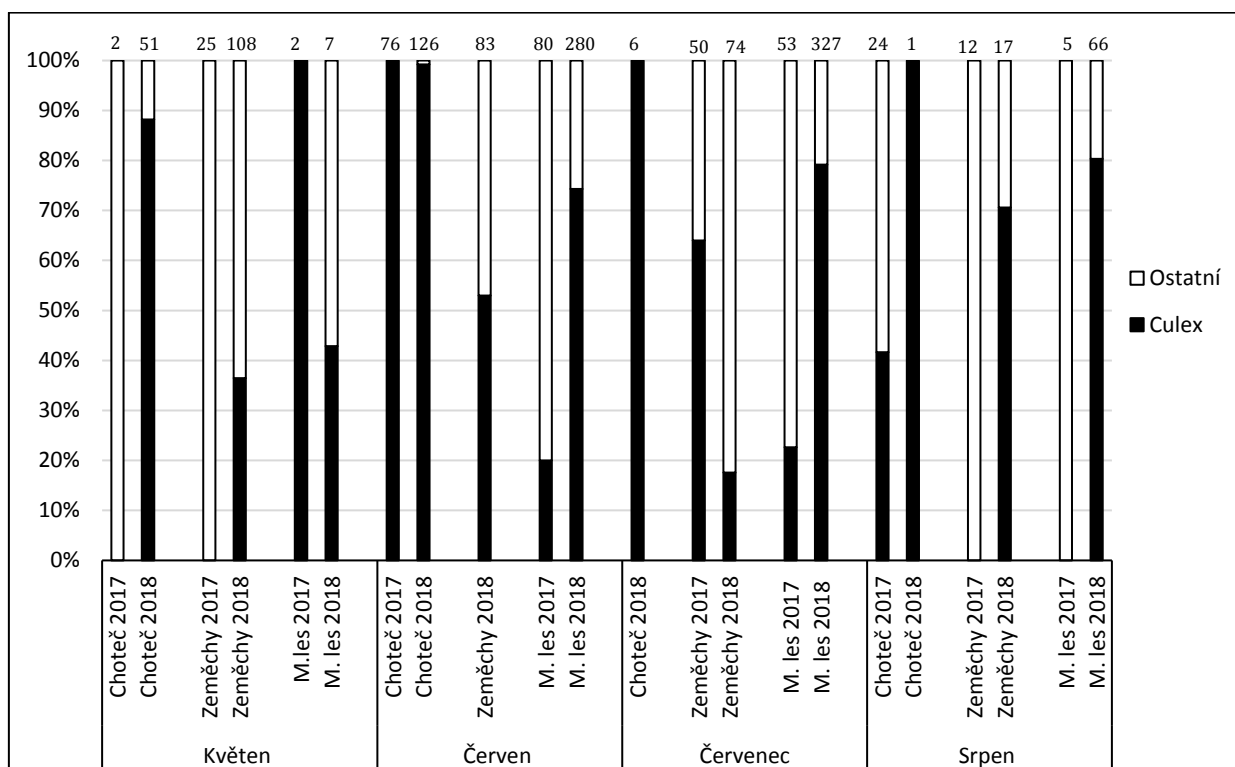
V roce 2017 bylo během 60 past'onocí (vždy 6x CDC past/noc) celkem odchyceno 329 komárů, z nichž 148 (45 %) náleželo k druhu *Cx. pipiens*. *Cx. modestus* byl v tomto roce zachycen pouze jednou, a to v červenci na lokalitě Zeměchy. V roce 2018 bylo během 72 past'onocí odchyceno celkem 1146 kusů komárů, z nichž 808 (70,5 %) náleželo druhu *Cx. pipiens*. Komár *Cx. modestus* byl v této sezoně odchycen celkem pětkrát, konkrétně 1 jedinec v srpnu v Zeměchách, a 4 jedinci v červenci v Milovickém lese. Počty komárů odchycených během jednoho odchyty se pohybují od 1 do 327 jedinců viz tab. 4. 2. Jelikož byly pasti během jedné noci umísťovány na malém území, výnosnost jednotlivých pastí není uváděna.

První komáři rodu *Culex* byli v pastech nalézáni už během května, ale nejvíce kusů bylo odchyceno v červnu a červenci: 83 % z celkového počtu všech odchycených komárů *Culex* (n=956). Procentuální zastoupení komárů rodu *Culex* z celkové masy odchycených komárů v jednotlivých měsících na jednotlivých lokalitách je uvedeno v obr. 4. 1. Komáři *Culex* byli během sezon roku 2017 i 2018 nejvíce zastoupeni na lokalitě Choteč, kde jejich prevalence dosahovala 84 % a 96 %. Procentuální zastoupení komárů *Culex* během celých sezon na jednotlivých lokalitách viz obr. 4.2.

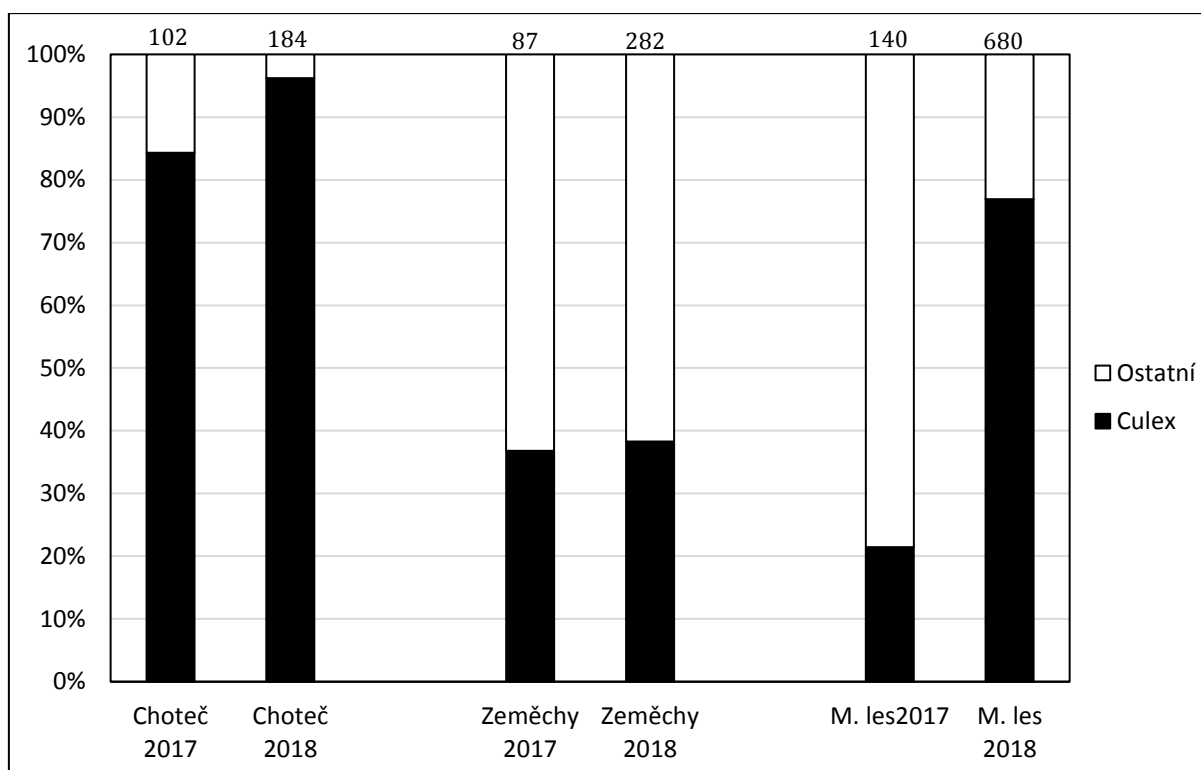
V červenci roku 2018 navíc proběhl mimořádný týdenní odchyt hmyzu v Milovickém lese. Během této doby bylo během 12 past'onocí odchyceno celkem 980 jedinců komárů. Z celkového počtu náleželo 449 (46 %) komárů k rodu *Culex*. Tito komáři nejsou do uváděných výsledků zahrnuti, jelikož jejich část je podrobena pitvě v Mikulově a zbytek, který je roztržěn do poolů a vyšetřen na přítomnost kinetoplastid by byl nad rámec standardních odchyťů = 1x měsíčně (květen-srpen) šest past'onocí na každé z lokalit.

Tab. 4. 2 Celkový počet odchytených komárů a celkový počet komárů rodu *Culex* rozdělený podle sezon, měsíců odchyty a odchyťových lokalit.

Sezona	Měsíc odchyty	Choteč		Zeměchy		Milovický les	
		Celkem komárů	Komáři <i>Culex</i>	Celkem komárů	Komáři <i>Culex</i>	Celkem komárů	Komáři <i>Culex</i>
2017	květen	2	0	25	0	2	2
	červen	76	76	Odchyt neproběhl		80	16
	červenec	Vyřazení vzorku		50	32	53	12
	srpen	24	10	12	0	5	0
2018	květen	51	45	108	39	7	3
	červen	126	125	83	44	280	208
	červenec	6	6	74	13	327	259
	srpen	1	1	17	12	66	53



Obr. 4. 1 Procentuální zastoupení komárů rodu *Culex* v sezoně 2017 a 2018 na lokalitách Choteč, Zeměchy, Milovický les (M. les) v jednotlivých měsících. Jsou zobrazeny všechny lokality, ve kterých odchyt proběhl a pro které bylo možné vzorek zpracovat, tedy i včetně těch, kde byl odchyten jediný komár (Choteč srpen 2018) i těch, kde z celkového počtu komárů ani jeden nepatřil k rodu *Culex* (Choteč květen 2017, Zeměchy květen 2017 a srpen 2017, Milovický les srpen 2017). Čísla nad sloupci značí počet odchytených komárů v daném měsíci.



Obr. 4. 2 Celkové zastoupení komárů rodu *Culex*, kteří byli odchyceni na jednotlivých lokalitách během sezony roku 2017 a 2018. Čísla nad sloupci značí celkový počet komárů odchycených za sezonu 2017 a 2018 na jednotlivých lokalitách.

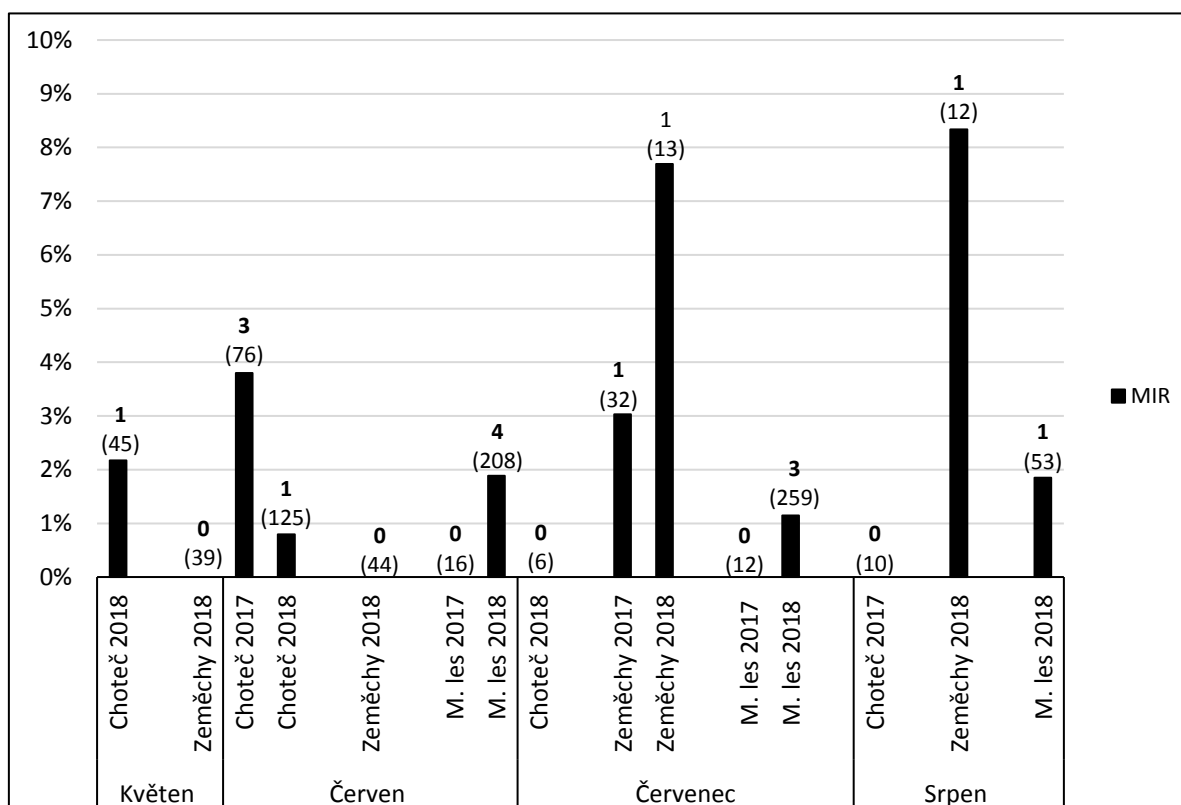
4.1.2 Vyšetření komárů rodu *Culex* na přítomnost ptačích trypanosom

Pro zjištění prevalence trypanosom u komárů rodu *Culex* byli tito komáři rozděleni do poolu podle jednotlivých lokalit a měsíců odchyty (tab. 4. 3). Celkem vzniklo 125 poolů ($n=956$ jedinců), trypanosomy byly přítomny v 17 poolech (13,6 %). V roce 2017 byly komáři rozděleni celkem do 23 poolu ($n=148$ jedinců), z nichž 17 % ($n=4$) bylo pozitivních pro *T. culicavium*. MIR (Minimal Infection Rate) pro rok 2017 byla 2,7 %. V roce 2018 byli komáři *Culex* rozděleni celkem do 102 poolů (808 jedinců), z nichž 12 % ($n=13$) poolů bylo pozitivních. Ve 12. případech (92 %) se jednalo o *T. culicavium*, v jednom případě se jednalo o *T. thomashancofti* (Choteč květen 2018). V roce 2018 byla MIR pro *T. culicavium* 1,48 % a pro *T. thomashancofti* 0,12 %. V roce 2018 jsme navíc u 3 poolů komárů rodu *Culex* detekovali jedno hostitelská trypanosomatida a u tří poolů se nepodařilo sekvenci rozklíčovat, pravděpodobně kvůli smíšené infekci (nejsou do výsledků zahrnuty). V obr. 4. 3 jsou znázorněny hodnoty MIR pro jednotlivé měsíce a lokality zvlášť. V obr. 4. 4 jsou zobrazeny hodnoty MIR za sezony 2017 a 2018 v jednotlivých lokalitách. Sekvence získaných izolátů *T. culicavium* se pode algoritmu

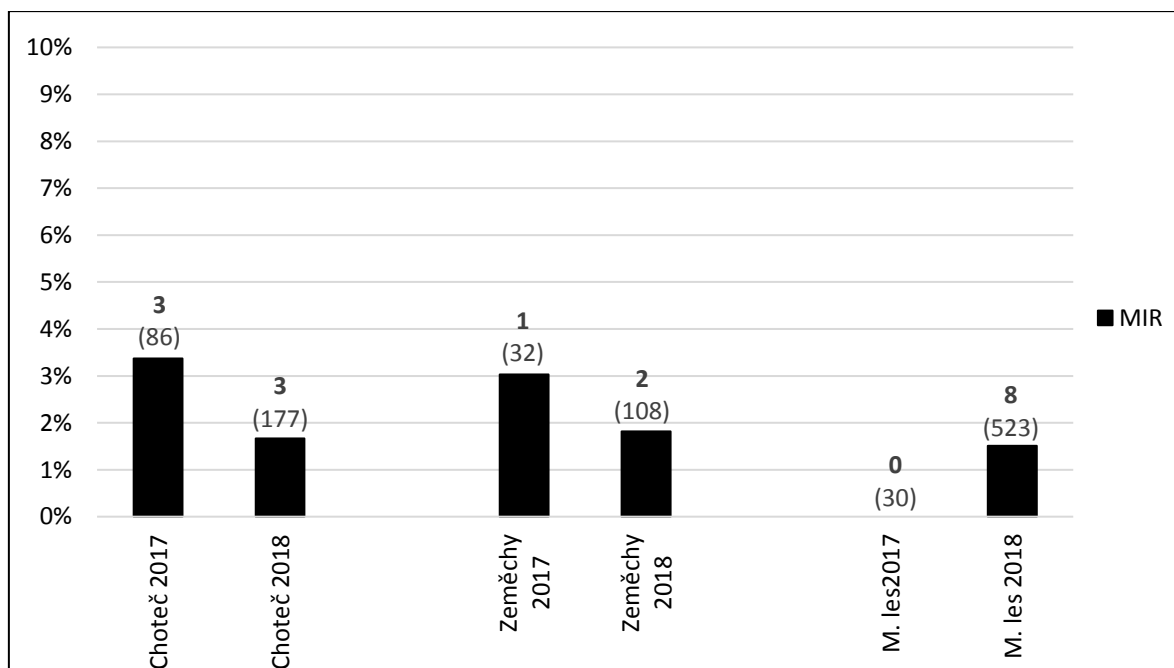
BLAST a nukleotidové databáze NCBI shodovaly s izolátem CUL 6 (Zídková a kol., 2012) a *T. thomasbancrofti* s izolátem CUL 15 (Zídková a kol., 2012).

Tab. 4. 3 Počty odchycených komárů a pozitivních poolů v jednotlivých lokalitách a měsících pro sezonu 2017 a 2018 (*T.ca* – *T. culicavium*, *T.tb* – *T. thomasbancrofti*).

Sezona	Lokalita	Měsíc	n <i>Culex</i>	n poolů	n pozitivních poolů	MIR (%)	<i>T. ca.</i>	<i>T. tb</i>
2017	Choteč	Květen	0	0	0	0		
		Červen	76	9	3	3,9	3	
		Červenec	Odchyt neproběhl					
		Srpen	10	1	0	0	0	
	Zeměchy	Květen	0		0	0	0	
		Červen	Vyřazení vzorku					
		Červenec	32	5	1	3,1	1	
		Srpen	0	0	0	0	0	
	Milovický les	Květen	2	2	0	0		
		Červen	16	4	0	0	0	
		Červenec	12	2	0	0	0	
		Srpen	0	0	0	0	0	
2018	Choteč	Květen	45	5	1	2,2		1
		Červen	125	13	1	0,8	1	
		Červenec	6	1	0	0	0	
		Srpen	1	1	1		1	
	Zeměchy	Květen	39	4	0	0	0	
		Červen	44	5	0	0	0	
		Červenec	13	2	1	7,6	1	
		Srpen	12	2	1	8,3	1	
	Milovický les	Květen	3	2	0	0		
		Červen	208	23	4	1,9	4	
		Červenec	259	31	3	1,1	3	
		Srpen	53	13	1	0	1	



Obr. 4. 3 MIR pro jednotlivé měsíce v jednotlivých lokalitách odchytů. Z grafu jsou vynechány měsíce, během kterých bylo za jednu past'onoc odchyceno méně jak 5 komárů. Ztučněné hodnoty uváděné nad jednotlivými sloupci značí počet pozitivních poolů, hodnoty v závorkách udávají počet komárů rodu *Culex* odchycených v daném měsíci.



Obr. 4. 4 MIR ptačích trypanosom za celou sezonu uváděná pro jednotlivé lokality zvlášť. Ztučněná čísla nad sloupci značí počet pozitivních poolů, čísla v závorkách počet komárů rodu *Culex* odchycených na jednotlivých lokalitách za sezonu 2017 a 2018.

4.1.3 Prevalence trypanosom po pitvách komárů z Milovického lesa

V sezoně roku 2017, kdy jsem se podílela na zpracovávání vzorků v laboratoři, bylo celkem vypitváno 162 komárů. Z těchto komárů bylo za pozitivní označeno 31 jedinců, kteří všichni spadali do druhu *Aedes vexans*. Z těchto komárů bylo 28 (90 %) infikováno *T. theileri*, zbylí komáři byli infikováni jednohostitelskými kinetoplastidy rodu *Crithidia* (n=3, 10 %). Pouze 5 zástupců rodu *Cx. pipiens* bylo podrobeno pitvě, všichni z nich byli negativní.

V sezoně roku 2018 jsem se podílela jak na samotných odchycích hmyzu, tak na pitvách a zpracování komárů v laboratoři. Bylo vypitváno celkem 250 komárů, z nichž 190 (76 %) jedinců náleželo k druhu *Cx. pipiens*. Z celkového počtu komárů rodu *Culex* bylo 15 komárů pozitivních, ve 14 případech se jednalo o *T. culicavium*, jejíž prevalence tedy činila 7,3 %. V jednom případě šlo o jednohostitelská trypanosomatida. Z vypitvaných a pozitivních komárů *Culex* se nám podařilo napěstovat a uchovat 9 kultur *T. culicavium*. Sekvence získaných izolátů *T. culicavium* ze střev i z kultur se pode algoritmu BLAST a nukleotidové databáze NCBI shodovaly s izolátem CUL 6 (Zídková a kol., 2012). Zbylé komáry vykazující přítomnost kinetoplastid tvořili především: *Ae. vexans*, ale i *Ae. punctator*, *An. plumbeus*, *Culiseta anulata* a *Mansonia richiardi*.

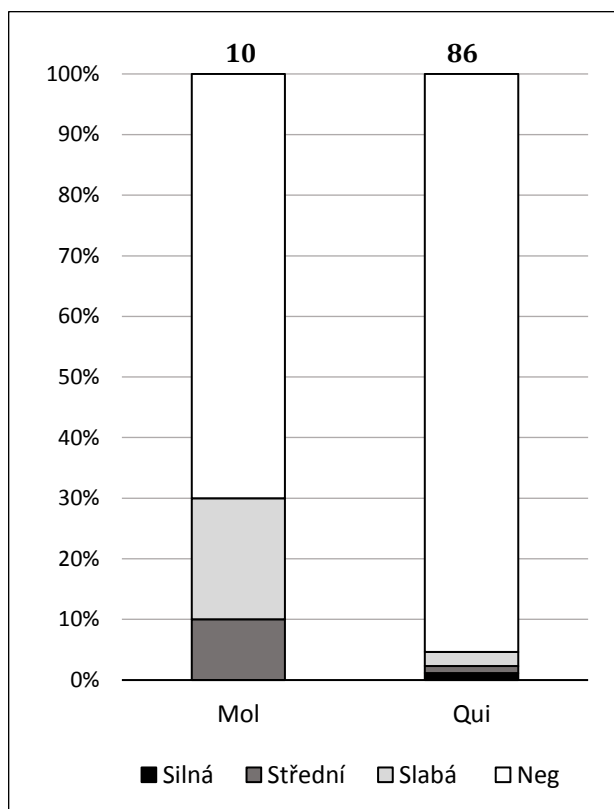
4.2 Infekční sání

Pro infekce byly použity izoláty trypanosom PAS 343, CUL 15 a CUL 5 (viz kapitola 3.5, tab. 3. 4). Izoláty PAS 343 a CUL 15 na základě SSU rDNA spadají do skupiny C, linie II (Zídková a kol., 2012) a shodují se izoláty pojmenovanými jako *T. thomasbancrofti* (Šlapeta a kol., 2016). Izolát CUL 5 je nepojmenovaná trypanosoma ze skupiny C, linie III (Zídková a kol., 2012).

4.2.1 Izolát CUL 15

Sání s tímto izolátem bylo provedeno pouze jednou. Byly vypitvány všechny nasáté samice. U komárů *Cx. molestus* dosahovala prevalence trypanosom 30 % a infekce byly většinou slabé. U komárů rodu *Cx. quinquefasciatus* dosahovala prevalence 4,6 % (viz obr. 4. 5).

U obou druhů komárů byla infekce lokalizována pouze v hindgutů (obr. 4. 11 A) a to v okolí rektálních žláz. Trypanosomy se nacházely většinou v podobě rozet, občas se v jejich blízkosti vyskytla malá bičíkatá stádia. Žádné změny lokalizace parazitů ve střevě nebyly zaznamenány.

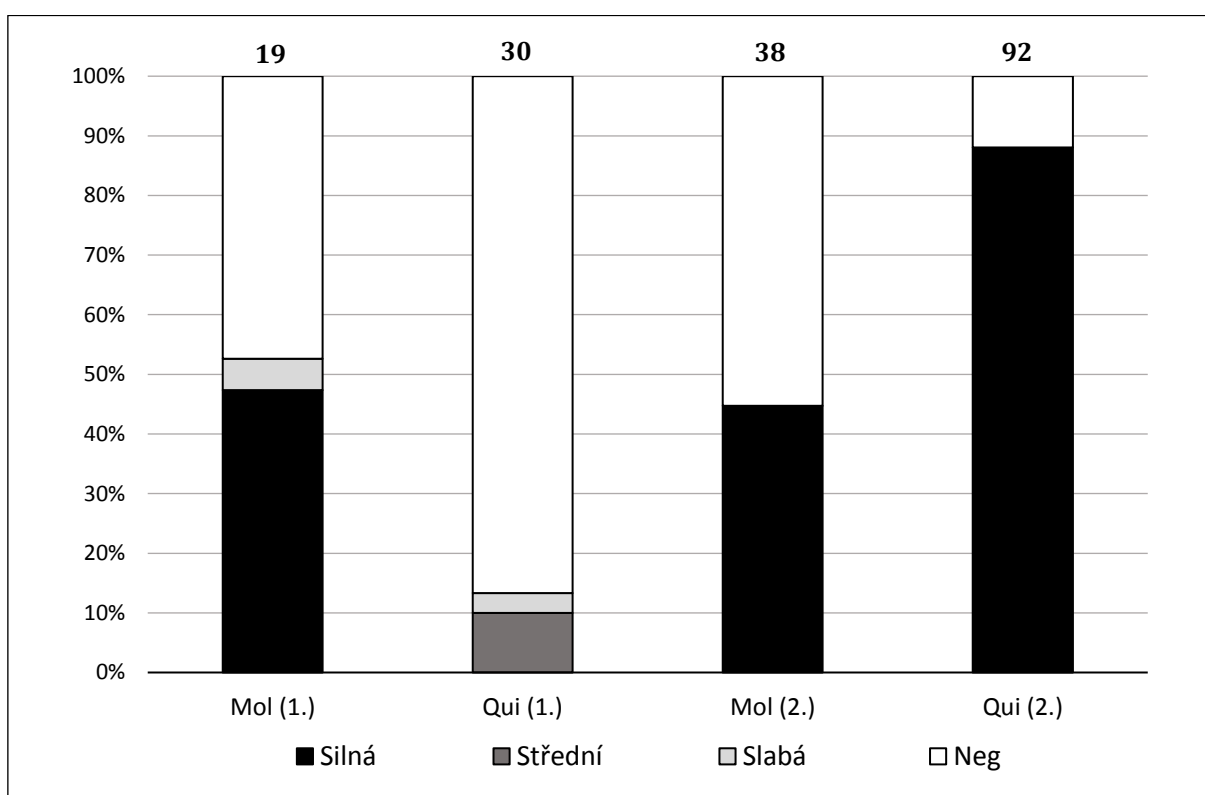


Obr. 4. 5 Porovnání intenzity infekce u vypitvaných komárů druhu *Cx. molestus* a *Cx. quinquefasciatus* po membránovém sání s izolátem CUL 15.

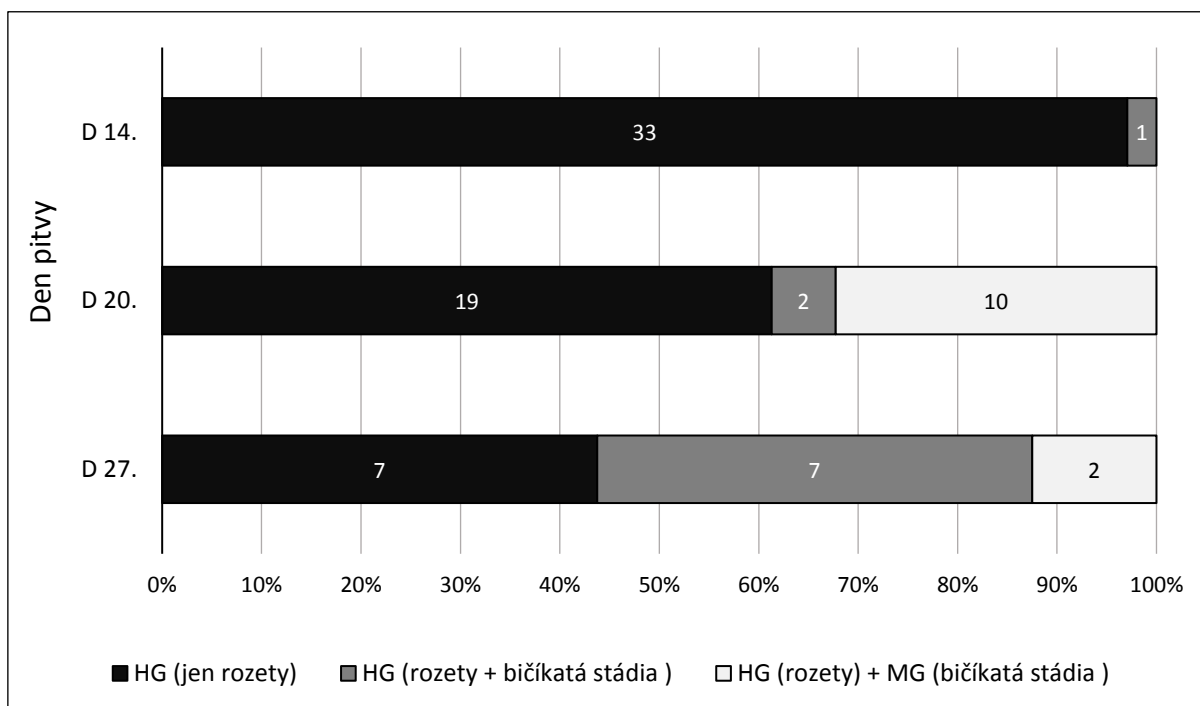
4.2.2 Izolát PAS 343

Sání s tímto izolátem bylo provedeno celkem dvakrát. Vzhledem k odlišným mírům infekce jsou hodnoty uvedeny pro každé infekční sání zvlášť (obr. 4. 6). Obě sání byla prováděna vždy se stejným inokulem trypanosom a s oběma druhy komárů ve stejný den. V prvním pokusu bylo vypitváno 12. den PI vypitváno 19 samic *Cx. molestus* a 13. den PI 30 samic *Cx. quinquefasciatus*. Z celkového počtu bylo infikováno 52 % (n=10) samic *Cx. molestus*, kde v 90 % se jednalo o infekce silné. U komárů *Cx. quinquefasciatus* bylo infikováno 13 % samic, a to převážně střední mírou infekce. V druhém pokusu bylo 13 den PI celkem vypitváno 38 samic *Cx. molestus*, kde 44 % (n=17) bylo infikovaných a ve 100 % se jednalo o infekce silné. Samice *Cx. quinquefasciatus* byly pitvány 14., 20. a 27. den PI. Z celkového počtu 92 jich 88 % (n=81) bylo infikováno a to vždy silnou intenzitou infekce.

Parazit se ve střevech nacházel většinou v hindgut v podobě rozet (obr. 4. 11 C,D). S přibývajícím dnem od infekce se navíc v hindgut (HG) společně s rozetami objevila i bičíkatá stádia, která v dalších dnech byla nacházena i v abdominálním midgut (MG). Vývoj infekce u komárů *Cx. quinquefasciatus* je možné vidět na obr. 4. 7. Tento fenomén se vzhledem k nízkému počtu nasátých samic *Cx. molestus* nepodařilo u tohoto druhu demonstrovat.



Obr. 4. 6 Porovnání intenzity infekce u vypitvaných komárů druhu *Cx. molestus* (Mol) a *Cx. quinquefasciatus* (Qui) po membránovém sání s izolátem trypanosomy PAS 343. Výsledky jsou uváděny pro první (Mol (1.), Qui (1.)) a druhé (Mol (2.), Qui (2.)) membránové sání zvlášť.



Obr. 4. 7 Změny lokalizace trypanosom ve střevech komárů *Cx. quinquefasciatus* experimentálně infikovaných izolátem trypanosomy PAS 343. Počty vypitvaných pozitivních samic jsou uváděny v jednotlivých sloupcích.

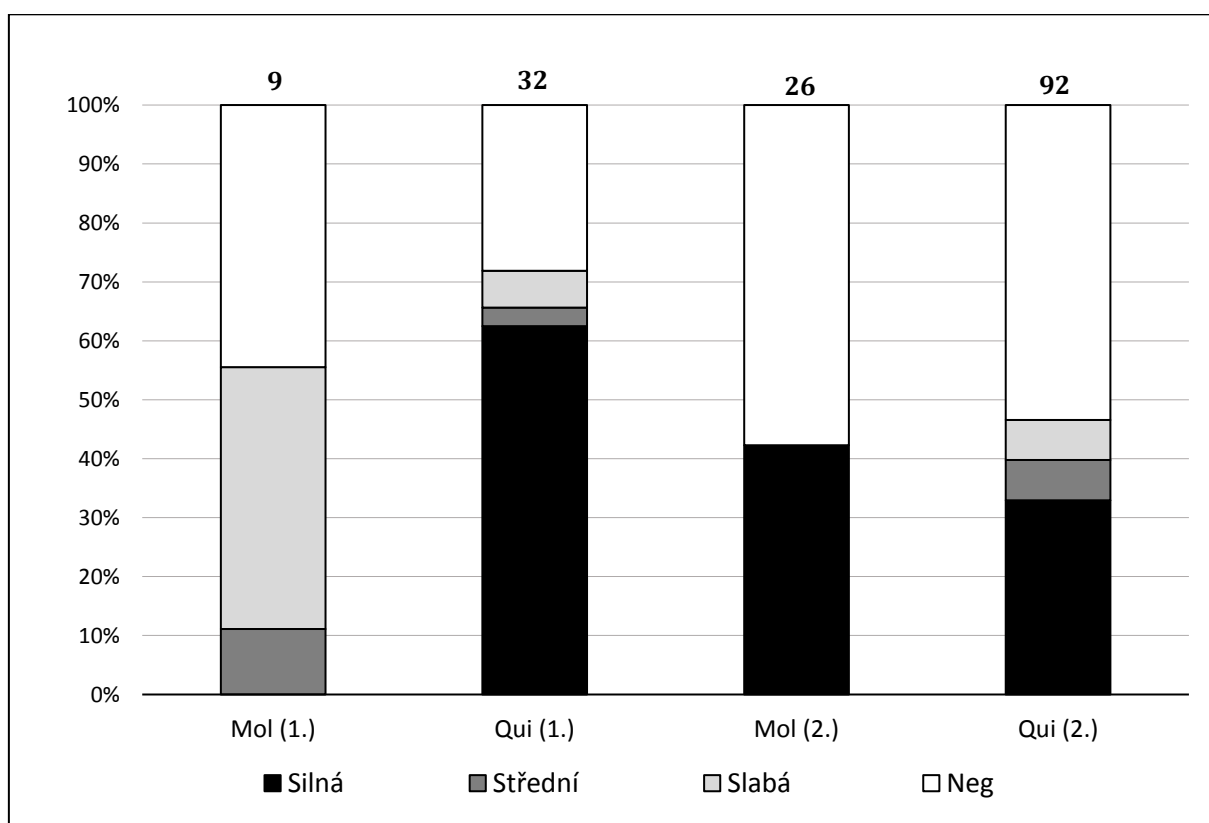
4.2.3 Izolát CUL 5

Membránové sání bylo s tímto izolátem provedeno celkem třikrát. V obr. 4. 8 jsou vzhledem k odlišným mírům infekce uváděny dvě první membránová sání zvlášť. Obě sání byla opět prováděna vždy se stejným inokulem trypanosom a s oběma druhy komárů ve stejný den. Třetí infekční sání bylo prováděno pro získání infikovaných střev k inokulaci zebříčky a vzhledem k nízkému počtu nasátých samic není graficky vyobrazeno. Při prvním pokusu bylo 13. den PI vypitváno celkem 9 samic *Cx. molestus*. Slabé až střední infekce byly nalezeny u 55 % samic. Samice *Cx. quinquefasciatus* byly pitvané 12. a 18. den PI. Z celkového počtu 32 jich bylo 72 % (n=23) pozitivních. Silné infekce byly nalezeny u 86 % (n=20) infikovaných samic. Při druhém membránovém sání bylo 16. den PI vypitváno celkem 26 samic *Cx. molestus* z nichž 42 % (n=11) bylo infikovaných. U 100 % infikovaných samic byla nalezena infekce silná. Samice *Cx. quinquefasciatus* v celkovém počtu 92 jedinců, byly pitvané 12., 19. a 49. den PI. Infekce se vyvinula u 45 % (n=41) samic. Silné infekce byly nalezeny u 70 % pozitivních samic *Cx. quinquefasciatus*. Při

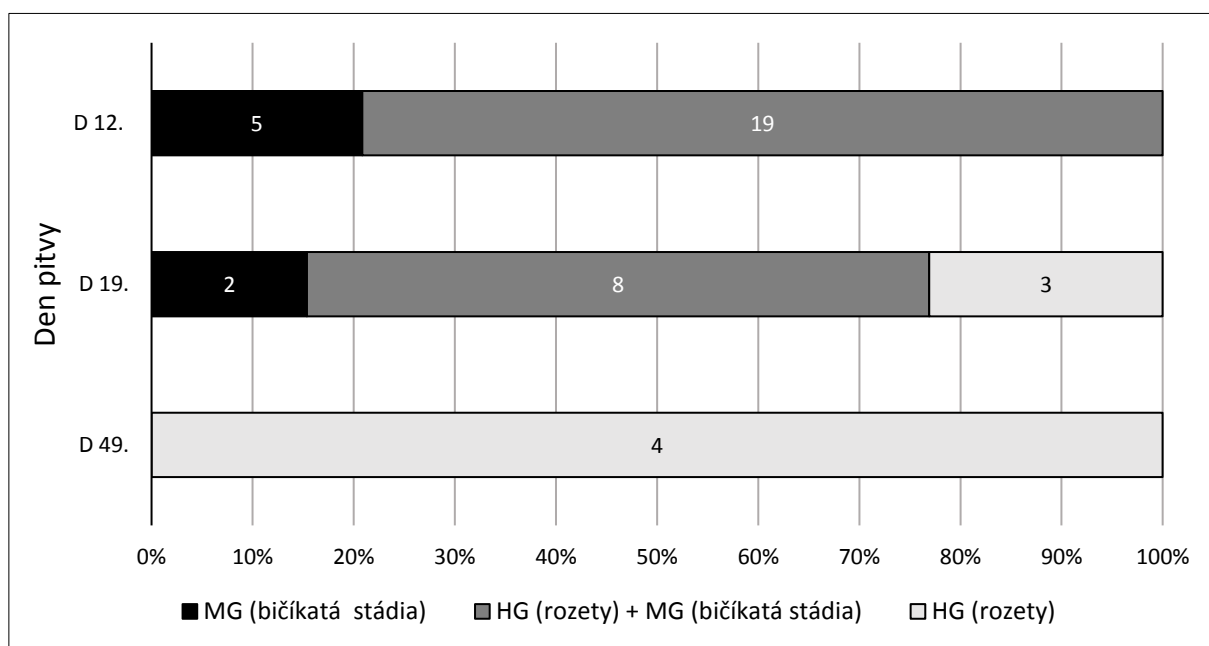
třetím pokusu bylo vypitváno celkem 18 samic komára *Cx. quinquefasciatus*, 72 % (n=13) samic bylo pozitivních, a to silnou infekcí ve 100 % případů.

Trypanosomy byly nejdříve lokalizovány pouze v midgut (MG) v podobě dlouhých bičíkatých epimastigotů. Dále byly nalézány jako bičíkatá stádia (obr. 4. 11 F) v midgut společně s rozetami v hindgut (HG) (obr. 4. 11 E). S narůstajícími dny od experimentální infekce byl u *Cx. quinquefasciatus* zaznamenán úbytek bičíkovců z MG vedoucí až k úplnému vymizení. Rozety v HG zůstávaly i s přibývajícími dny. Změny lokalizace trypanosom ve střevě jsou graficky znázorněny v obr. 4. 9. Vzhledem k nižším počtům nasátých samic *Cx. molestus*, tudíž nemožnosti rozdělit pitvy do více dní, nebyly změny lokalizace u tohoto druhu sledovány.

Poté co byl zaznamenán společný výskyt bičíkovců a rozet ve dvou různých částech střeva (HG a MG), byla střeva rozdělena a HG i MG byli zvlášť podrobeny nested PCR a následné sekvenaci. Bylo potvrzeno, že se jedná o totožnou trypanosomu, a ne o koinfekci dvou odlišných druhů.



Obr. 4. 8 Porovnání intenzity infekce u komárů *Cx. molestus* (Mol) a *Cx. quinquefasciatus* (Qui) po membránovém sání s izolátem CUL 5. Výsledky jsou uváděny pro první (Mol (1.), Qui (1.)) a druhé (Mol (2.), Qui (2.)) membránové sání



Obr. 4. 9 Změny lokalizace trypanosom ve střevech komárů *Cx. quinquefasciatus* experimentálně infikovaných izolátem trypanosomy CUL 5. Počty vypitvaných pozitivních samic jsou uváděny v jednotlivých sloupcích.

4.3 Pokusy s laboratorními pěvcí

Pro experimentální inokulaci pěvců byla využita střeva komárů infikovaná PAS 343 a CUL 5.

4.3.1 Inokulace pěvců izolátem PAS 343

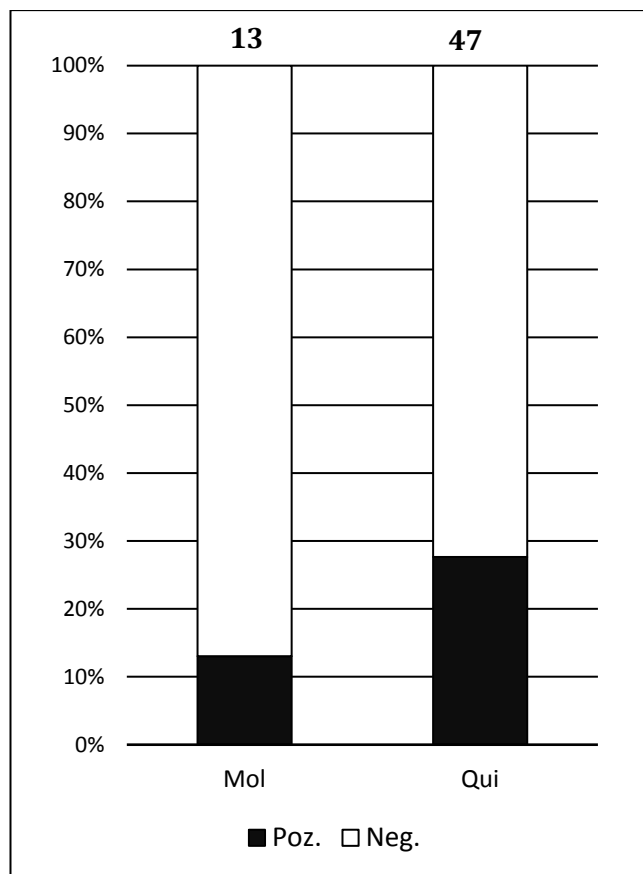
V tomto pokusu byli experimentálně inokulováni jeden kanár (C1) a dvě zebřičky pestré (Z2 a Z3). Nejdříve byl současně perorálně inokulován kanár C1 a zebřička Z1. V tomto případě byla použita silně infikovaná střeva osmi komárů *Cx. molestus*, vypitvána 13. den od membránového sání. Později byla inokulována ještě druhá zebřička (Z3), a to infikovanými střevy šesti komárů *Cx. quinquefasciatus*, vypitvanými 20. den PI. Infekce se podařilo dosáhnout u kanára C1 a zebřičky Z2. Kanár C1 byl pozitivní ještě 102. dní od inokulace, zebřička Z1 byla pozitivní pouze jednou a to 29. den od inokulace (

Tab. 4. 4).

Tab. 4. 4 Výsledky pokusu experimentální inokulace ptáků izolátem trypanosomy PAS 343.

Pták	Infekce	Kultivace	Xeno.	Poprvé pozitivní	Naposledy pozitivní	Poslední kontrola
kanár (C1)	perorálně	+	+	52. den (kultiv.)	102. den (xeno.)	213. den (xeno.)
zebřička (Z2)	perorálně	+	-	29. den (kultiv.)	29. den (kultiv.)	213. den (kultiv.)
zebřička (Z3)	perorálně	-	-	-	-	206. den (kultiv.)

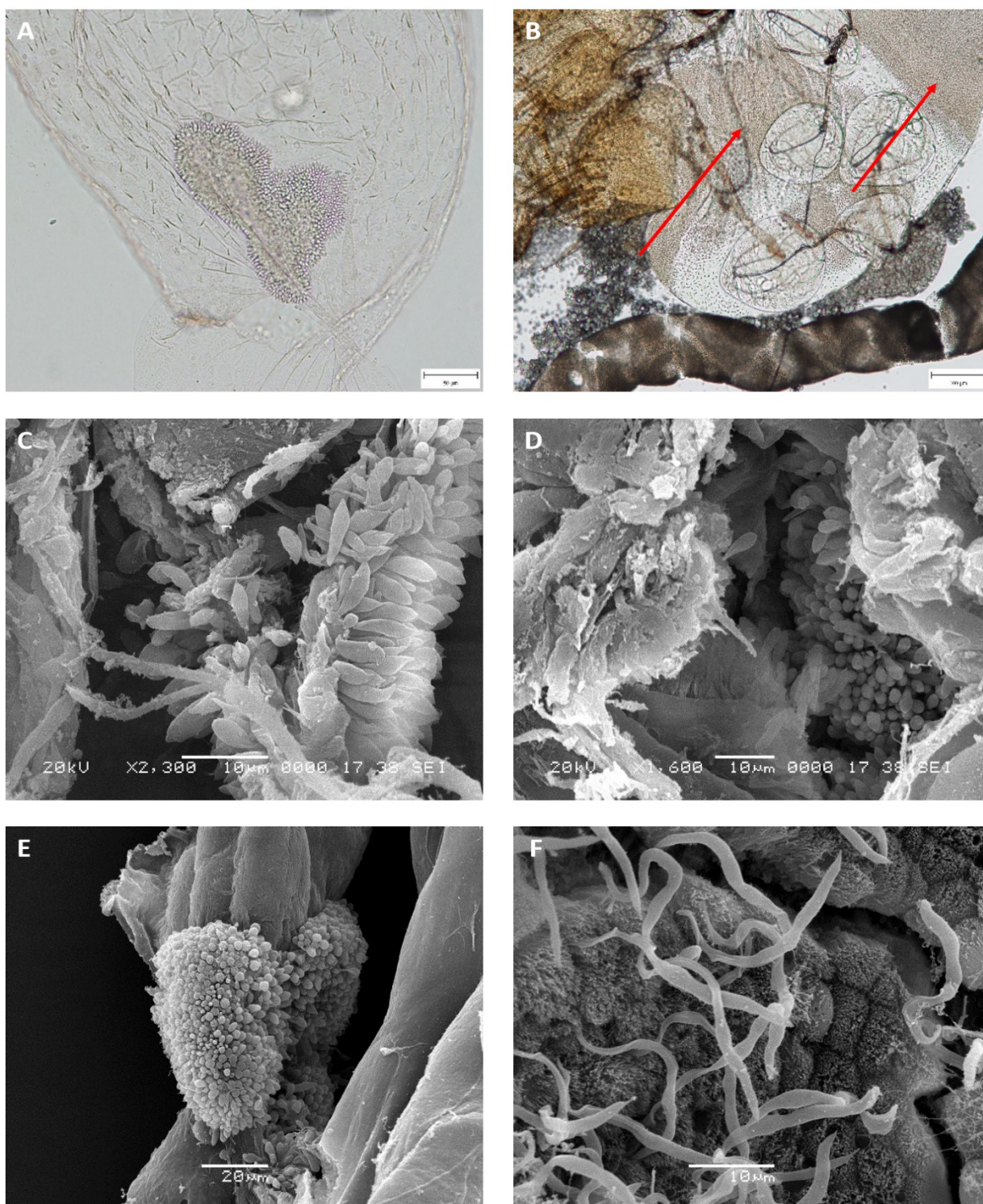
Vzhledem k výsledkům z kultivace krve pěvců, byli do xenodiagnostických pokusů zahrnuti pouze pták C1 a Z3. Pokusy byly úspěšné v případě kanára C1, kdy se na něm nasálo celkem 23 komárů *Cx. molestus*, z nichž bylo po pitvě 13 % pozitivních. Z 47 nasátých samic *Cx. quinquefasciatus* bylo pozitivních 26,5 % (viz obr. 4. 10). Infekce byly silné a byly lokalizovány v hindgutů stejně jako po membránovém sání (obr. 4. 11 B). Pro potvrzení, že se u komárů jedná o stejný druh trypanosomy jako u inokulovaných ptáků, byla vybraná pozitivní střeva a testována pomocí PCR a sekvenční analýzy, které nám shodu potvrdili. Komáři nasátí na zebřičce byli vždy negativní.



Obr. 4. 10 Porovnání procentuálního zastoupení pozitivních samic *Cx. molestus* (Mol) a *Cx. quinquefasciatus* (Qui) po sání na kanárovi (C1) infikovaným kmenem trypanosomy PAS 343.

4.3.2 Infekce pěvců izolátem CUL 5

Zebřička (Z4) byla experimentálně inokulována deseti silně pozitivními střevi komárů *Cx. quinquefasciatus*, vypitvaných 11 den PI izolátem CUL 5. Zebřičce byla odebrána krev celkem čtyřikrát, poslední odběr byl proveden 75. den od inokulace. Všechny kultivace periferní krve byly negativní. Stejně tak byl pták negativní i při xenodiagnostických pokusech, kdy z 22 vypitvaných *Cx. molestus* a 7 *Cx. quinquefasciatus* nebyl ani jeden z komárů pozitivní.



Obr. 4. 11 A-infekce izolátem CUL 15, lokalizované v hindgutu komára *Cx. quinquefasciatus* (zdroj MS) /B-infekce u komára *Cx. quinquefasciatus* nasátém na experimentálně inokulovaném kanárovi izolátem PAS 343 (zdroj MS)/ C-D-snímky ze střev komárů infikovaných *T. thomashancrofti* (PAS 343) z elektronového mikroskopu (zdroj MF)/ E-F- Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující rozety v hindgutu (E) a volné bičíkovce v midgutu (F) u střev komárů infikovaných *Trypanosoma* sp. (CUL 5) (zdroj MF).

5 Diskuse

5.1 Sezonní dynamika

Během této diplomové práce byli odchytáváni komáři pomocí CDC pastí. Hlavní pozornost byla věnována komárům rodu *Culex*, jakožto přenašečům ptačích trypanosom, konkrétně druhům *Cx. pipiens* a *Cx. modestus*. *Culex pipiens* je při vyhledávání hostitele orientován především na ptáky (Lura a kol., 2012; Munoz a kol., 2012; Osório a kol., 2012; Rádrová a kol., 2013), zatímco *Cx. modestus* je ve výběru potravy více oportunní. V proběhlých studiích byla v jeho střevech nalézána krev ptačí i savčí, včetně lidské, bez výrazné preference (Baleinghein a kol., 2007; Rádrová a kol., 2013). V námi odchycených komárech byla nalezena krev u 6 zástupců komárů *Cx. pipiens*. Ovšem pravděpodobně z důvodů přílišného natrávení krve nebylo ani při opětovných pokusech možné zdroj potravy identifikovat (Oshaghi a kol., 2006; Martínez-de la Puente a kol., 2013).

Důležitým faktorem ovlivňujícím výskyt komárů je počasí a jeho změny (Olejníček a kol., 2004; Reisen a kol., 2008; Rádrová a kol., 2013; Rioz a kol., 2014). Ačkoli v roce 2017 proběhlo o 12 pastí méně, rozdíl v množství odchycených komárů rodu *Culex* v jednotlivých letech je značný. V roce 2017 bylo odchyceno 361 jedinců a v roce 2018 1146 jedinců, kdy tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny právě vývojem počasí (sucho, množství srážek) v jednotlivých sezonách. V námi studovaném období se nejvíce komárů *Culex* vyskytovalo na vrcholu léta, tedy v měsíci červen a červenec. Během těchto měsíců bylo odchyceno celkem 81 % jedinců ze všech komárů rodu *Culex*. Obdobných výsledků bylo dosahováno i v jiných studiích (Fischer a Schweigman 2004; Šebesta a kol., 2013). Ovšem kromě podnebí zaujímá velice důležitou roli v prevalenci komárů i typ prostředí (Chaves 2011; Rioz a kol., 2015; Zittra a kol., 2017), což se ukázalo i v námi sledovaných lokalitách. Celkově bylo nejvíce komárů odchyceno v Milovickém lese (n=820), dále v Zeměchách (n=369) a nejméně v nejsušší z oblastí, v Chotči (n=286). Komárů *Cx. pipiens*, jejichž vajíčka jsou náchylná na vyschnutí, bylo paradoxně nejvíce odchyceno právě v nejsušší oblasti, Chotči. Z celkové masy komárů pocházejících z této lokality tvořili 84 % v roce 2017 a 96 % v roce 2018. Tento vysoký výskyt může být spojen s hustou a nízkou vegetací, kde hnízdí mnoho ptáků, kteří jsou potenciálním zdrojem potravy pro komáry rodu *Culex* (Lura a kol., 2012; Munoz a kol., 2012; Osório a kol., 2012; Rádrová a kol., 2013), i s jejich preferencí pro vyhledávání potravy níže u země (Černý a kol., 2011). Oproti předešlé, lokalita Zeměchy je charakteristická rákosinami a potůčkem,

který i v období sucha zůstává na lokalitě alespoň v podobě kaluží mezi rákosem. Dalo by se tedy očekávat, že v této oblasti bude zastoupení komárů *Culex* vysoké. Ale v obou odchyťových sezonách jsme zaznamenali jejich prevalenci pohybující se okolo 35 %. Zbytek komárů byl tvořený převážně druhem *Ae. vexans*, kteří jako zdroj potravy volí většinou velké savce (Magnarelli 1977; Nasci, 1984; Molaei a Andreadis, 2000; Börstler a kol., 2016). Jejich větší zastoupení v této oblasti je nejspíše spojeno s potokem, který při deštích zaplaví místa, kam samičky nakladly vajíčka, jelikož kladou do míst, která budou zaplavena později (Kramář, 1958; Volf a kol., 2007). V Milovickém lese tvořili komáři rodu *Culex* 21 % v roce 2017 a 77 % v roce 2018. Je tedy vidět, že v této lokalitě je meziroční početnost těchto komárů velice kolísavá a je s největší pravděpodobností závislá na množství srážek a vývoji podnebí. Ale až výsledky z právě probíhající odchyťové sezony (2019) odhalí, zdali bude výše uváděný průběh pro jednotlivé lokality typický.

Mezi odchycenými komáry rodu *Culex* byl zcela dominantní druh *Cx. pipiens*, ale na našem území se vyskytuje i druh *Cx. modestus*. Tento druh byl v Česku nejdříve popisován jako spíše vzácný (Minář, 1969; Kramář, 1958), později je ale uváděn s vysokou prevalencí ve studiích s větším množstvím odchycených komárů (Votýpka a kol., 2008, Votýpka a kol., 2012.) Při našich odchycích byl ovšem komár *Cx. modestus* zachycen pouze jednou v roce 2017 a pětkrát v roce 2018. Výskyt komárů tohoto druhu je vázán na mokřady a vlhčí biotopy (Votýpka a kol., 2008, Rádrová a kol., 2013). Tomu odpovídají i naše výsledky, protože v nejsušší Chotči nebyl *Cx. modestus* odchycen žádný. Chycení jedinci pocházeli z lokalit Zeměchy (n=2) a Milovický les (n=4), které jsou při přízni počasí vlhčí a pro komáry *Cx. modestus* tedy o něco příznivější. Nejvíce jedinců pocházelo z jižní Moravy, kde tento druh uváděl jako středně hojný i Minář (1969).

5.2 Prevalence ptačích trypanosom v komárech rodu *Culex*

Prevalence ptačích trypanosom mezi komáry je prozatím poměrně neznámá, jelikož byla sledována jen v malém počtu studií (Van Dyken a kol., 2006; Svobodová a kol., 2015b; Schoener a kol., 2018, 2019). V této diplomové práci jsme se zabývali prevalencí trypanosom v komárech rodu *Culex*. Při odchycích jsme ovšem ve velkém počtu chytili i komáry odlišných rodů, především rodu *Aedes*, u nichž jsme detekovali nejčastěji savčí *T. theiler/cervi*, ptačí trypanosomy u nich nalezeny nebyly. Avšak v několika případech byla zaznamenána i jednohostitelská trypanosomatida.

V předešlé studii z Česka byli krevsající členovci (Culicidae, Simuliidae a Hippoboscidae) mikroskopicky vyšetřováni na přítomnost ptačích trypanosom, kde byla prevalence těchto parazitů 8,2 % mezi komáry *Cx. pipiens*. Nejčastěji byla detekována *T. culicavium* (Svobodová a kol., 2015b). V námi pitvaných komárech dosahovala prevalence ptačích trypanosom u druhu *Cx. pipiens* podobných hodnot, konkrétně 7,3 % a všichni ptačí paraziti náleželi k druhu *T. culicavium*. Tato trypanosoma byla nejčastější i po PCR vyšetření poolů komárů v Rakousku (Schoener a kol., 2018; Schoener a kol., 2019). I v námi odchycených a do poolů rozdělených komárech se jednalo o nejčastěji zastoupenou trypanosomu, *T. culicavium* byla detekována v 13,6 % z celkového počtu 125 poolů (956 jedinců) komárů rodu *Culex* a její MIR bylo 2,7 % v roce 2017 a 1,48 % v roce 2018. Pouze v roce 2018 byl detekován jediný pool, který obsahoval zástupce ze skupiny *T. avium*. Jednalo se o *T. thomashancrofti* jejíž MIR tak v sezoně roku 2018 dosahovalo 0,12 %. Jak z našich, tak i z předešlých studií (Svobodová a kol., 2015b; Schoener a kol., 2018, 2019) je patrné, že komár není běžným přenašečem *T. avium*. Jejich nejčastějším vektorem jsou muchničky (Votýpka a kol., 2002; Votýpka a Svobodová, 2004), u nichž prevalence dosahuje až 60 % (Svobodová a kol., 2015b).

Ačkoliv Choteč je lokalita s nejvyšší prevalencí komáru rodu *Culex*, prevalence ptačích trypanosom (MIR) v jednotlivých sezonách je mezi odchycenými jedinci v této oblasti obdobná jako v Zeměchách. Na obou lokalitách se MIR v roce 2017 pohybovala okolo 3 % a v roce 2018 dosahoval 2 %. Naproti tomu vývoj v Milovickém lese je zcela opačný. V roce 2017 se nám nepodařilo identifikovat ptačí trypanosomy ani v jednom případě, ale v roce 2018 se pozitivní výsledek objevil u 8 poolů a MIR tak stoupla z 0 % na 1,5 %. MIR fluktovala bez jednoznačného trendu i mezi jednotlivými měsíci, kdy se pohybovala v rozmezí od 0 % do 8,3 %. Bohužel se u většiny lokalit nepodařilo skrze měsíce odchytit takové množství komárů rodu *Culex*, aby se MIR dala dobře vyhodnotit. Nicméně jednou z lokalit, kde se to povedlo, jsou Zeměchy 2018, kde stejně jako Schoener a kol. (2018) můžeme pozorovat zvyšující se MIR s postupem od brzkého léta k pozdnímu. Částečně i podle našich výsledků, kdy zvyšující procentuální prevalenci pozitivních poolů, a tedy i nenulovou MIR lze zaznamenat zejména v letních měsících, ale především z biologie ptačích trypanosom lze očekávat, že prevalence těchto parazitů bude mezi komáry vyšší na vrcholku léta tedy na vrcholku hnízdní sezony. Ptačí trypanosomy totiž nejsou mezi komáry přenášeny transovariálně, infekce se tedy vyvine pouze u samic, které se nasají na ptácích, v jejichž periferní krvi paraziti kolují. Trypanosomy se ovšem nevyskytují

v periferní krvi ptáků stále, protože na zimu se stahují do kostní dřeně (Baker 1956b; Kučera 1983). V periferní krvi ptáků se objeví při nástupu hnízdění, což souvisí se stresem a s oslabením z důvodu snášení vajec a shánění potravy (Kučera 1983; Rintamäki, 1999; Deviche a kol. 2001; Valkiunas a kol., 2004), ale také s hlavní sezonou výskytu hmyzu, tedy potenciálních vektorů.

Prevalence ptačích trypanosom mezi komáry je tedy poměrně nízká, jak bylo zmíněno výše, v námi studovaném období dosahovala maximální hodnoty 8,3 % (MIR). Tato skutečnost odpovídá i nízké prevalenci trypanosom, které jsou přenášeny komáry, mezi ptáky. Z celkového počtu 3279 vyšetřených ptáků byly tyto trypanosomy nalezeny v periferní krvi pouze u 40 jedinců, tedy u 1,2 % (Dolník, Fialová, Svobodová, nepublikovaná data). Nejčastěji se jednalo o *T. culicavium* (n=24), dále o stejně často zastoupené *T. thomasbancrofti* (n=8) a *Trypanosoma* sp. skupina C, linie III (n=8). I přesto, že bylo vyšetřeno velké množství ptáků a v laboratorních podmínkách jsou komáři dobře vnímavými vektory, se zdá, že trypanosomy přenášeny komáry jsou vzácnější v porovnání s trypanosomami odlišných vektorů.

5.3 Experimentální infekce laboratorních komárů

Vývojem ptačích trypanosom v komárech se zabývá několik starších prací. David a Nair (1955) popisují trypanosomy lokalizované ve slinných žlázách komárů *Cx. fatigans* po sání na pozitivních pěvcích. Bennett (1961, 1970) naproti tomu popisuje trypanosomy lokalizované v hindgutů komárů *Ae. aegypti*. Prozatím se ale jen v případě *T. culicavium* podařilo experimentálně prokázat, že jejím vektorem je komár (Votýpka a kol., 2012). Existují ovšem i další dva druhy trypanosom, u nichž je na základě nalezení v komárech i ptačích hostitelích předpokládáno, že jejich vektorem bude komár. Jsou jimi konkrétně *T. thomasbancrofti* (Šlapeta a kol., 2016) a *Trypanosoma* sp. ze skupiny C, linie III (Zídková a kol., 2012) a právě s těmito druhy trypanosom jsem v této diplomové práci pracovala. Pro experimentální infekce laboratorních komárů *Cx. quinquefasciatus* a *Cx. molestus* byly vybrány tři izoláty trypanosom označené CUL 15, PAS 343 a CUL 5, spadající podle SSU rRNA do skupiny C linie II (*T. thomasbancrofti*) a C linie III (*Trypanosoma* sp.) (Zídková a kol., 2012).

Izolát CUL 15 byl získán ze zadní části střeva komára *Cx. pipiens*. Podle SSU rRNA je tento izolát téměř shodný s *T. thomasbancrofti* (Zídková a kol., 2012; Šlapeta a kol., 2016). Po membránovém sání byla infekce u laboratorních komárů *Cx. quinquefasciatus*

i *Cx. molestus* lokalizovaná vždy v zadním střevě. Lokalizace tedy byla shodná s lokalizací trypanosom z muchniček, řazených do stejné skupiny *T. avium* (Votýpka a kol., 2002; Votýpka a Svobodová, 2004) i s trypanosomami, s nimiž pracoval Bennett (1970). Infekce se úspěšně vyvíjely v obou druzích komárů a přetrvávaly až do 17. dne od infekce, jejich prevalence ale byla nízká. O něco vnímavější jsou k této trypanosomě komáři *Cx. molestus*, kde se infekce vyvinula u 30 % samic. Výsledek ale může být ovlivněn nízkým počtem vypitvaných samic. Infekce u *Cx. quinquefasciatus* se vyvinuly pouze u 4,6 % samic, ale na rozdíl od *Cx. molestus*, byla v jednom případě nalezena infekce silná. Vzhledem k předešlým neúspěšným pokusům o infekci komárů (Szabová, 2008) jsme se rozhodli v práci s tímto izolátem nepokračovat.

Izolát PAS 343 byl získán z odebrané krve budníčka lesního (*Phylloscopus sibilatrix*) a stejně jako izolát CUL 15 je dle SSU rRNA téměř shodný s trypanosomou *T. thomashamiltoni* (Zídková a kol., 2012; Šlapeta a kol., 2016). Infekce se ochotně vyvíjela u obou druhů laboratorních komárů. Míra infekce byla u naprosté většiny jedinců velice silná. Membránové sání s tímto izolátem bylo provedeno celkem dvakrát. U zhruba 45 % samic komárů *Cx. molestus* se při prvním i druhém pokusu projevila silná infekce. Nicméně u komárů *Cx. quinquefasciatus* se v prvním případě objevily infekce u 13 % samic, které byly slabé a střední intenzity, v druhém pokusu se naopak objevovaly pouze silné infekce u všech pozitivních samic, kterých bylo 88 % z vypitvaného celku. Metodika při obou sáních byla totožná, odlišnosti v prevalenci tedy musí být způsobené vnějšími vlivy či odlišnou kvalitou kultur trypanosom použitých při prvním a druhém pokusu.

Izolát CUL 5 byl získán z midgutů a stomodeální valvy komára *Cx. pipiens* a dle SSU rRNA je řazený stejně jako předešlé izoláty do skupiny C, ale do odlišné linie, konkrétně linie III (Zídková a kol., 2012). Po membránové sání byly pozitivní infekce nalézány v komárech *Cx. molestus* i *Cx. quinquefasciatus*. Ve velké míře byly intenzity infekce silné. Komáři *Cx. quinquefasciatus* se v obou provedených membránových sáních jeví jako lépe vnímavý druh. Rozdíl v intenzitách infekce v prvním a druhém pokusu mezi komáři *Cx. molestus* je vzhledem k totožnému metodickému postupu, stejně jako u izolátu PAS 343, způsoben pravděpodobně vnějšími vlivy či odlišnou kvalitou rozmražených kultur.

Vývoj infekcí ptačích trypanosom ve střevech krevsajících členovců je popisován u několika druhů dvoukřídlého hmyzu. U muchniček se epimastigoti dělí při trávení krve

v midgutů a po prasknutí peritrofické membrány migrují paraziti do hindgutů a rekta, kde se přichytí chitinózní výstelky pomocí hemidesmosomů (Bennett 1970; Votýpka a Svobodová, 2004). Podobně to zaznamenal i Bennett (1970) u infekce vyvíjející se ve střevech komára *Ae. aegypti*, či Baker (1956a) u kloše *Ornithomyia avicularia*. Obdobný vývoj byl zaznamenán i u námi studovaných izolátů CUL 15 a PAS 343, tedy izolátu *T. thomashancofti*. U izolátu CUL 15 byly infekce lokalizovány pouze v rektu. U Izolátu PAS 343 se však s přibývajícímí dny od infekce lokalizace trypanosom ve střevě komárů *Cx. quinquefasciatus* měnila. V nejčasnějších infekcích bylo ve střevě vydefekovaných komárů možné nalézt převážně rozety v hindgutů, s přibývajícímí dny se v hindgutů navíc objevovala drobná bičíkatá stádia, která v některých případech zasáhla i midgut. Předpokládáme, že právě tato volná stádia jsou metacyklická a střeva s nimi proto byla používána do pokusů experimentální inokulace pěvců. Obdobný trend byl i u komárů *Cx. molestus*, ale vzhledem k nižšímu počtu nasátých samic nebylo možné tento vývoj sledovat po potřebnou dobu. Ačkoli izoláty *T. thomashancofti* i *Trypanosoma* sp. spadají do totožné skupiny *T. avuim* (Zídková a kol., 2012) vývoj infekce u izolátu trypanosomy CUL 5 byl odlišný. Tato trypanosoma se v nejčasnějších infekcích po kompletním strávení krve objevovala v abdominálním midgutů v podobě dlouhých bičíkovců. S přibývajícímí dny od infekce zůstávali bičíkovci stále v midgutů, ale objevovaly se i rozety v hindgutů. 49. den pitvy už nebylo možné u žádného z pozitivních komárů nalézt trypanosomy jinde než v hindgutů. U komára *Cx. pipiens*, ze kterého byl izolát CUL 5 původně získán, se infekce vyskytovala v celém midgutů a na stomodeální valvě, z našich výsledků je tedy pravděpodobné, že se jednalo o časnou infekci, jelikož nebyli žádní paraziti nalezeni v hindgutů. I Svobodová a kol. (2015b) popisují krom infekcí v hindgutů a midgutů i nálezy na stomodeální valvě. Při mé práci nebyli v žádném z komárů nalezeni paraziti na stomodeální valvě.

5.4 Experimentální inokulace laboratorních pěvců

Životní cykly a cesty přenosu ptačích trypanosom zůstávají prozatím poměrně neobjasněny. Doposud objevený způsob přenosu parazitů na ptačího hostitele se může odehrát alimentární cestou, skrze pozření infekčního vektora, či díky defekaci hmyzu během jeho sání, kdy jsou metacyklická stádia obsažena ve výkalech (Votýpka a Svobodová, 2004; Votýpka a kol., 2012; Svobodová a kol., 2017; Svobodová a Rádrová, 2018). Za vektory ptačích trypanosom jsou považováni muchničky (Simuliidae), kloši

(Hippoboscidae), komáři (Culicidae), tiplíci (Ceratopogonidae) a flebotomové (Psychodidae) (Baker 1956; Bennett, 1961; Votýpka a kol., 2002; Votýpka a Svobodová, 2004; Votýpka a kol., 2012; Svobodová a kol., 2015b, 2017; Svobodová a Rádrová, 2018). V případě komárů byly publikovány různé studie, ve kterých se autoři snažili o přenos ptačích trypanosom na ptáky konzumací nakažených komárů, sáním komárů na ptácích či přes narušenou ptačí pokožku, všechny z těchto pokusů však byly neúspěšné (Bennett 1961; Chatterjee, 1977). Až v případě *T. culicavium* se podařilo dosáhnout úspěšného experimentálního přenosu na ptačí hostitele, a to perorálním podáním infikovaných střev kanárům (Votýpka a kol., 2012). V našich pokusech jsme se snažili experimentálně dokázat cyklus *T. thomashancofti* (Zídková a kol., 2012; Šlapeta a kol., 2016) a *Trypanosoma* sp C, III (Zídková a kol., 2012). Pro inokulaci pěvců byla využita střeva komárů infikovaná izolátem PAS 343 a CUL 5. Izolát CUL 15 nebyl z důvodů slabých infekcí do pokusů zařazen. Lokalizace zvolených trypanosom byla vždy v zadním střevě, proto jsme předpokládali, že stejně jako *T. avium* z muchniček, tiplíků a flebotomů (Votýpka a Svobodová, 2004; Svobodová a kol., 2017; Svobodová a Rádrová, 2018), budou i tyto trypanosomy přenášeny perorálně. Vzhledem k lokalizaci je možné, že by dalším možným způsobem mohl být i přenos přes oční spojivku (Votýpka a Svobodová, 2004), tento způsob jsme však vzhledem k omezenému počtu laboratorních ptáků netestovali.

Střeva infikovaná *T. thomashancofti* (PAS 343) byla využita k perorální inokulaci jednoho kanára a dvou zebříček. Infekce se projevila u dvou inokulovaných ptáků. U kanára byla infekce potvrzena poprvé pomocí kultivace periferní krve odebrané 52. den od experimentální inokulace. Následně byla prováděna i xenodiagnostika. Trypanosomy ve střevech komárů nasátých na kanárovi byly lokalizovány v hindgutů ve stejných místech jako po membránovém sání. Z 23 na kanárovi nasátých *Cx. molestus* bylo pozitivních 13 % a z 47 samic *Cx. quinquefasciatus* 26,5 %. Kanár byl naposledy pozitivní 102. den po experimentální inokulaci. U infikované zebříčky se infekci podařilo zjistit pouze jednou, pomocí kultivace periferní krve 29. den od inokulace. Při dalších kultivačních i xenodiagnostických pokusech se jevila jako negativní. Obdobná situace nastala i v pokusech Svobodové a kol. (2017), kdy kanár byl pozitivní (kultivace) pouze 168. den od inokulace. Náhle objevení parazitů v periferní krvi může být spojené se stresem, který je způsobený například každotýdenním odchytům z důvodů odbírání krve, či s pářením, změnou fotoperiody atd. Vliv stresu na objevení se trypanosom v krvi byl demonstrován na přirozeně infikovaných pěnicích černohlavých (*Sylvia atricapilla*)

(Valkiunas a kol., 2004). Nepřítomnost trypanosom v periferní krvi ovšem neznamena, že pták není infikován. Životní cyklus trypanosom je totiž spojen s migrací do kostní dřeně a následnými relapsy (Kučera, 1983; Rintamäki, 1999; Deviche a kol., 2001). Naše pokusy potvrdily, že *T. thomashancofti* může být v přírodě přenášena komáry, a to po pozření infekčního vektora. Pravděpodobným hostitelem bude hmyzožravý pták, což dokládá i fakt, že do skupiny *T. thomashancofti* (C, linie II) byly zařazeny i izoláty z budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*) (Zídková a kol., 2012). Dále byla nalezena v krvi rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*), pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*), vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*), budníčka lesního (*Phylloscopus sibilatrix*) a budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) (Svobodová, nepublikovaná data).

Střeva infikovaná *Trypanosoma* sp. (CUL 5) byla využita k perorální inokulaci jediné zebříčky. Tato zebříčka ovšem byla po celou dobu kontrol negativní při kultivaci periferní krve i při xenodiagnostice. I v tomto případě jsme předpokládali, že přenos bude perorálním pozřením infikovaných vektorů, jednak kvůli lokalizaci parazitů v hindgutů a také proto, že v přírodě byla tato trypanosoma vyizolována z hmyzožravých ptáků. V Česku byla nalezena konkrétně u budníčka menšího, brhlíka lesního (*Sitta europaea*) a lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) (Zídková a kol., 2012) a dále také u pěnice černohlavé, pěnice pokřovní (*Sylvia curruca*), budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*), vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska šedého (*Muscicapa striata*) (Svobodová, nepublikovaná data). Neúspěch inokulace je pravděpodobně spojen s nedostatečně vyvinutou infekcí u komárů, pro inokulaci byla použita střeva 11. den po infekci. Zebříčka také nemusí být vhodný laboratorním modelem pro tuto trypanosomu. Tyto hypotézy ovšem bude nutné ověřit v následných pokusech.

6 Shrnutí

- Zastoupení komárů rodu *Culex* bylo 45 % z celkového počtu 329 odchycených komárů v roce 2017 a 71 % z 1146 odchycených komárů v roce 2018.
- Nejvíce komárů rodu *Culex* bylo odchyceno během měsíce červen a červenec. Jejich prevalence byla v obou letech nejvyšší v Chotči (84 % a 96 %), nejsušší oblasti s křovinami.
- Z celkového počtu 125 poolů (n=956) komárů rodu *Culex*, bylo ptačími trypanosomami infikováno 18 poolů. V sedmnácti případech se jednalo o *T. culicavium*, v jednom o *T. thomashancrofti*.
- *T. culicavium* byla detekována v obou sezonách. Její hodnota MIR v roce 2017 dosahovala 2,7 % a 1,46 % v roce 2018. *T. thomashancrofti* byla detekována pouze v roce 2018, kdy bylo její MIR 0,12 %.
- MIR se v jednotlivých měsících pohybovala od 0 % do 8,3 %.
- Prevalence ptačích trypanosom po pitvách komárů rodu *Culex* v červenci 2018 v Milovickém lese, dosahovala 7,3 %. U všech čtrnácti pozitivních komárů se jednalo o *T. culicavium*.
- Infekce *T. thomashancrofti* se vyvíjely u komárů *Cx. quinquefasciatus* i *Cx. molestus*. Jejich lokalizace byla v podobě rozet v hindgut. S přibývajícím dnem se okolo rozet objevovala malá bičíkatá stádia, která byla u některých samic nalezena i v abdominálním midgut.
- Infekce *Trypanosoma* sp. se vyvíjely u obou druhů laboratorních komárů. Lokalizace těchto trypanosom byla od počátku v midgut, kde se nacházeli dlouzí bičíkovci, společně s infekcí v hindgut v podobě rozet. S postupem času se počet trypanosom v midgut zmenšoval, až vymizely zcela, zbyly pouze rozety v hindgut.
- Experimentální inokulace byly úspěšné u dvou pěvců, a to po perorálním podání střev komárů infikovaných izolátem *T. thomashancrofti*. V případě *Trypanosoma* sp. se infekce nepotvrdila.
- V komárech nasátých na experimentálně infikovaném kanárovi se vyvinuly infekce u 13 % komárů *Cx. molestus* a u 26,5 % komáru *Cx. quinquefasciatus*. U zebřičky se podařilo potvrdit infekci pouze kultivačně.

7 Závěr

V této diplomové práci bylo demonstrováno, že prevalence ptačích trypanosom mezi volně žijícími komáry je poměrně nízká. Za odchytové sezony dosahovala MIR *T. culicavium* maximálně 2,7 % a *T. thomashancrofti* 0,12 %. Komár bude v porovnání s ostatními krevsajícími členovci pravděpodobně méně častým přenašečem ptačích trypanosom, což vyplývá i nízké prevalence těchto parazitů mezi ptáky.

Dále se v laboratorních podmínkách zdařil experimentální přenos *T. thomashancrofti*, a to jak na laboratorní komáry, tak i na laboratorní pěvce po perorální inokulaci. Vektorová role komára byla potvrzena poté, co se u nich vyvinula infekce i přirozenou cestou po sání na experimentálně infikovaných pěvcích. Ačkoli mají trypanosomy různou lokalizaci ve střevech komárů, kdy *T. culicavium* se nachází na stomodeální valvě a *T. thomashancrofti* zejména v hindgut, bude přenos pozřením infekčního vektora pravděpodobně univerzálním způsobem při přenosu ptačích trypanosom v přírodě.

8 Literatura

- Apanius, V. (1991). Avian trypanosomes as models of hemoflagellate evolution. *Parasitology today*, 7(4), 87-90.
- Baker, J. R., (1976). Biology of the trypanosomes of birds. In: Lumsden W. H. and Evans D. A. (eds.): *Biology of the Kinetoplastida Volume 1*. Academia press, London, 131- 174.
- Baker, J. R. (1956a). Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 II. Transmission by *Ornithomyia avicularia* L. *Parasitology*, 46, 321-334.
- Baker, J. R. (1956b). Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 III. Life cycle in vertebrate and invertebrate hosts. *Parasitology*, 46, 321-334.
- Balenghien, T., Vazeille, M., Reiter, P., Schaffner, F., Zeller, H., & Bicout, D. J. (2007). Evidence of laboratory vector competence of *Culex modestus* for West Nile virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2), 233-237.
- Bennett, G. F. (1961). On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. *Canadian Journal of Zoology*, 39(1), 17-33.
- Bennett, G. F. (1962). The hematocrit centrifuge for laboratory diagnosis of hematozoa. *Canadian Journal of Zoology*, 40(1), 124-5.
- Bennett, G. F. (1970). *Trypanosoma avium* Danilewsky in the avian host. *Canadian Journal of Zoology*, 48(1), 803-807.
- Bennett, G. F., & Fallis, A. M. (1960). Blood parasites of birds in Algonquin Park, Canada, and a discussion of their transmission. *Canadian Journal of Zoology*, 38(2), 261-273.
- Börstler, J., Jöst, H., Garms, R., Krüger, A., Tannich, E., Becker, N., Schmidt-Canasit, J., & Lühken, R. (2016). Host-feeding patterns of mosquito species in Germany. *Parasites & vectors*, 9(1), 318.
- Cooper, C., Thompson, R. A., Botero, A., Kristancic, A., Peacock, C., Kirilak, Y., & Clode, P. L. (2017). A comparative molecular and 3-dimensional structural investigation into cross-continental and novel avian *Trypanosoma* spp. in Australia. *Parasites & vectors*, 10(1), 234.
- Černý, O., Votýpka, J., & Svobodová, M. (2011). Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(1), 104-108.

- David, A., & Nair, C. P. (1955). Observations on a natural (cryptic) Infection of Trypanosomes in sparrows (*Passer domesticus Linnaeus*.) Part I. Susceptibility of birds and mammals to the trypanosomes. *Indian Journal of Malariology*, 9, 95-8.
- Demaree, Jr. R. S., & Marquardt, W. C. (1971). Avian trypanosome division; A light and electron microscope study 1. *The Journal of protozoology*, 18(3), 388-391.
- Desser, S. S., McIver, S. B., & Jez, D. (1975). Observations on the role of Simuliids and Culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. *International Journal for Parasitology*, 5(5), 507-509.
- Desser, S. S., McIver, S. B., & Ryckman, A. (1973). *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *The Journal of parasitology*, 353-358.
- Deviche, P., Greiner, E. C., & Manteca, X. (2001). Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *Journal of Experimental Zoology*, 289(7), 456-466.
- Diamond, L. S., & Herman, C. M. (1954). Incidence of trypanosomes in the Canada goose as revealed by bone marrow culture. *Journal of Parasitology*, 40(2), 195-202.
- Fallis, A. M., Jacobson, R. L., & Raybould, J. N. (1973). Experimental transmission of *Trypanosoma numidae* Wenyon to guinea fowl and chickens in Tanzania. *The Journal of protozoology*, 20(3), 436-437.
- Fischer, S., & Schweigmann, N. (2004). *Culex* mosquitoes in temporary urban rain pools: seasonal dynamics and relation to environmental variables. *J Vector Ecol*, 29(2), 365-73.
- Flegontov, P., Votýpka, J., Skalický, T., Logacheva, M. D., Penin, A. A., Tanifuji, G., Ondera, N. T., Kondrashov, A. S., Archibald, J. M. & Lukeš, J. (2013). *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Current Biology*, 23(18), 1787-1793.
- Gonzalez, A. D., Matta, N. E., Ellis, V. A., Miller, E. T., Ricklefs, R. E., & Gutierrez, H. R. (2014). Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. *PLoS One*, 9(6), e100695.

- Gonzalez, A. D., Matta, N. E., Ellis, V. A., Miller, E. T., Ricklefs, R. E., & Gutierrez, H. R. (2014). Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. *PLoS One*, 9(6), e100695.
- Hamer, G. L., Anderson, T. K., Berry, G. E., Makohon-Moore, A. P., Crafton, J. C., Brawn, J. D., Dolinsky, A. C., Krebs, B. L., Ruiz, M. O., Muzzall, P., M., Goldberg, T. L., & Walker, E. D. (2013). Prevalence of filarioid nematodes and trypanosomes in American robins and house sparrows, Chicago USA. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 42-49.
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science*, 218, 384-387.
- Hertig, M., & McConnell, E. (1963). Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 14(1), 92-106.
- Hudec, K. & Šťastný, K. (2005). Fauna ČR: Ptáci 2/I, II. Praha: Academia
- Chatterjee, D. K. (1977). Development of *T. avium bakeri* Chatterjee and Ray, 1971 in *Aedes albopictus* and its subsequent transmission to birds. *Indian Journal of Parasitology*, 1, 97-100.
- Chatterjee, D. K., & Ray, H. N. (1971). Some observations on the morphology and developmental stages of *Trypanosoma avium bakeri* ssp. nov. from the red-whiskered bulbul (*Otocompsa jocosa* Linn.). *Parasitology*, 62(2), 331-338.
- Chaves, L. F., Hamer, G. L., Walker, E. D., Brown, W. M., Ruiz, M. O., & Kitron, U. D. (2011). Climatic variability and landscape heterogeneity impact urban mosquito diversity and vector abundance and infection. *Ecosphere*, 2(6), 1-21.
- Kato, H., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Vargas, F., Mimori, T., Yamamoto, K., et al. (2011). Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5), 515-521.
- Kirkpatrick, C. E., & Suthers, H. B. (1988). Epizootiology of blood parasite infections in passerine birds from central New Jersey. *Canadian Journal of Zoology*, 66(11), 2374-2382.
- Kramář, J. (1958.). Fauna ČSR. Svazek 13. Komáři bodaví-Culicinae / Praha: Nakladatelství Československé akademie věd 285 s.

- Kučera, J. (1982). Blood parasites of birds in Central Europe. 4. *Trypanosoma*, *Atoxoplasma*, *Microfilariae* and other rare haematozoa. *Folia Parasitologica*, 29, 107-113.
- Kučera, J. (1983). Incidence and some ecological aspects of avian trypanosomes in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica*, 30, 209-222.
- Lukeš, J., & Votýpka, J. (2000). *Trypanosoma avium*: Novel features of the kinetoplast structure. *Experimental Parasitology*, 96, 178-181.
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 1, 495-502.
- Lumpkin, D. C., Murphy, T. G., & Tarvin, K. A. (2014). Blood parasite infection differentially relates to carotenoid-based plumage and bill color in the American goldfinch. *Ecology and Evolution*, 4, 3210-3217.
- Lura, T., Cummings, R., Velten, R., De Collibus, K., Morgan, T., Nguyen, K., & Gerry, A. (2012). Host (avian) biting preference of southern California *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 49(3), 687-696.
- Magnarelli, L. A. (1977). Host feeding patterns of Connecticut mosquitoes (Diptera: Culicidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 26(3), 547-552.
- Martínez-de la Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2013). Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. *Malaria journal*, 12(1), 109.
- Maslov, D. A., Lukeš, J., Jirku, M., & Simpson, L. (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and biochemical parasitology*, 75(2), 197-205.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2), 491-499.
- Miltgen, F., & Landau, I. (1982). *Culicoides nubeculosus*, an experimental vector of a new trypanosome from psittaciforms: *Trypanosoma barkeri* n. sp. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 57, 423-428.

- Minar, J. (1969). A contribution to the bionomy of *Culex modestus* Fic. (Diptera, Culicidae) in southern Moravia. *Folia Parasitologica*, 16, 93-96.
- Molaei, G., & Andreadis, T. G. (2006). Identification of avian-and mammalian-derived bloodmeals in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and its implication for West Nile virus transmission in Connecticut, USA. *Journal of medical entomology*, 43(5), 1088-1093
- Molyneux, D. H. (1973). *Trypanosoma bouffardi* of west african Ploceidae (Aves). *Parasitology*, 66(1), 215-230.
- Molyneux, D. H., Cooper, J. E., & Smith, W. J. (1983). Studies on the pathology of an avian trypanosome (*T. bouffardi*) infection in experimentally infected canaries. *Parasitology*, 87(1), 49-54.
- Mungomba, L. M., Molyneux, D. H., & Wallbanks, K. R. (1989). Host-parasite relationship of *Trypanosoma corvi* in *Ornithomyia avicularia*. *Parasitology research*, 75(3), 167-174.
- Muñoz, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Alcaide, M., Viana, D. S., Roiz, D., Vázquez, A. & Figuerola, J. (2012). Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. *PloS one*, 7(6), e39549.
- Nair, C. P., & David, A. (1956). Observations on a natural (cryptic) infection of trypanosomes in sparrows (*Passer domesticus* Linnaeus). Part II. Attempts at experimental transmission and determination of the sites of infection in birds and mosquitoes. *Indian Journal of Malariology*, 10, 137-147.
- Nasci, R. S. (1984). Variations in the blood-feeding patterns of *Aedes vexans* and *Aedes trivittatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 21(1), 95-99.
- Oakgrove, K. S., Harrigan, R. J., Loiseau, C., Guers, S., Seppi, B., & Sehgal, R. N. (2014). Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. *International journal for parasitology*, 44(10), 717-727.
- Olejníček, J., Minář, J., & Gelbič, I. (2004). Changes in biodiversity of mosquitoes in the years 2002–2003 caused by climatic changes in the Morava river basin. *Acta Facultatis Ecologiae*, 12 (1), 115-121.

- Oshaghi, M. A., Chavshin, A. R., Vatandoost, H., Yaaghoobi, F., Mohtarami, F., & Noorjah, N. (2006). Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Experimental parasitology*, 112(4), 232-236.
- Osório, H. C., Zé-Zé, L., & Alves, M. J. (2012). Host-feeding patterns of *Culex pipiens* and other potential mosquito vectors (Diptera: Culicidae) of West Nile virus (Flaviviridae) collected in Portugal. *Journal of medical entomology*, 49(3), 717-721.
- Rádrová, J., Seblova, V., & Votýpka, J. (2013). Feeding behavior and spatial distribution of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in wetland areas of the Czech Republic. *Journal of medical entomology*, 50(5), 1097-1104.
- Reisen, W. K., Cayan, D., Tyree, M., Barker, C. M., Eldridge, B., & Dettinger, M. (2008). Impact of climate variation on mosquito abundance in California. *Journal of vector ecology*, 33(1), 89-99.
- Rintamäki, P. T., Huhta, E., Jokimäki, J., & Squires-Parsons, D. (1999). Leucocytozoonosis and trypanosomiasis in redstarts in Finland. *Journal of Wildlife Diseases*, 35, 603-607.
- Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2014). Climatic effects on mosquito abundance in Mediterranean wetlands. *Parasites & vectors*, 7(1), 333.
- Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2015). Landscape effects on the presence, abundance and diversity of mosquitoes in Mediterranean wetlands. *PLoS One*, 10(6), e0128112.
- Sádlová, J., & Volf, P. (1999). Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology*, 118, 455-460.
- Sádlová, J., Rinsing, J., & Volf, P. (1998). Prediuresis in female *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). *European Journal of Entomology*, 95, 643-647.
- Sehgal, R. N., Jones, H. I., & Smith, T. B. (2001). Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology*, 10(9), 2319-2327.
- Sehgal, R. N., Jones, H. I., & Smith, T. B. (2005). Blood parasites of some West African rainforest birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67, 295-301.

- Schoener, E. R., Harl, J., Himmel, T., Fragner, K., Weissenböck, H., & Fuehrer, H. P. (2019). Protozoan parasites in *Culex pipiens* mosquitoes in Vienna. *Parasitology research*, 118(4), 1261-1269.
- Schoener, E., Uebleis, S. S., Cuk, C., Nawratil, M., Obwaller, A. G., Zechmeister, T., Lebl, K., Rádrová, J., Zittra, C., Votýpka, J., & Fuehrer, H. P. (2018). Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. *PloS one*, 13(4), e0196052.
- Stabler, R. M., Holt, P. A., & Kitzmiller, N. J. (1966). *Trypanosoma avium* in the blood and bone marrow from 677 Colorado birds. *Journal of Parasitology*, 52(6), 1141-4.
- Svobodová, M., & Rádrová, J. (2018). Phlebotomine sandflies-potential vectors of avian trypanosomes. *Acta Protozoologica*, 2018(1), 53-59.
- Svobodová, M., & Votýpka, J. (1998). Výskyt krevních prvoků u dravců (Falconiformes). *Buteo*, 10, 51-56.
- Svobodová, M., Dolník, O. V., Čepička, I., & Rádrová, J. (2017). Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. *Parasites & vectors*, 10(1), 224.
- Svobodová, M., Volf, P., & Votýpka, J. (2015b). Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera. *Medical and veterinary entomology*, 29(4), 444-447.
- Svobodová, M., Weidinger, K., Peške, L., Volf, P., Votýpka, J., & Voříšek, P. (2015a). Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. *Parasitology research*, 114(2), 551-560.
- Szabová, J. (2008). Kinetoplastida komárov: prenos a prirodzení hostitelia.
- Šebesta, O., Gelbič, I., & Peško, J. (2013). Seasonal dynamics of mosquito occurrence in the Lower Dyje River basin at the Czech-Slovak-Austrian border. *Italian journal of zoology*, 80(1), 125-138.
- Šlapeta, J., Morin-Adeline, V., Thompson, P., Mcdonell, D., Shiels, M., Gilchrist, K., Votýpka, J., & Vogelnest, L. (2016). Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology*, 143(8), 1012-1025.

- Valkiūnas, G., Bairlein, F., Iezhova, T. A., & Dolnik, O. V. (2004). Factors affecting the relapse of *Haemoproteus belopolskyi* infections and the parasitaemia of *Trypanosoma* spp. in a naturally infected European songbird, the blackcap, *Sylvia atricapilla*. *Parasitology research*, 93(3), 218-222.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., & Shapoval, A. P. (2003). High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. *Journal of Natural History*, 37(22), 2647-2652.
- Van Dyken, M., Bolling, B. G., Moore, C. G., Blair, C. D., Beaty, B. J., Black IV, W. C., & Foy, B. D. (2006). Molecular evidence for trypanosomatids in *Culex* mosquitoes collected during a West Nile virus survey. *International journal for parasitology*, 36(9), 1015-1023.
- Volf, P., Hajmová, M., Sadlová, J., & Votýpka, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*, 34(11), 1221-1227.
- Volf, P., & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton.
- Votýpka, J., & Svobodová, M. (2004). *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*, 92(2), 147-151.
- Votýpka, J., Lukeš, J., & Oborník, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. *Acta Protozool*, 43, 225-231.
- Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M., & Lukeš, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125, 253-263.
- Votýpka, J., Rádrová, J., Skalický, T., Jirků, M., Jirsová, D., Mihalca, A. D., D'Amico, G., Petrželková, K. J., Modrý, D. & Lukeš, J. (2015). A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. *International journal for parasitology*, 45(12), 741-748.
- Votýpka, J., Szabová, J., Rádrová, J., Zídková, L., & Svobodová, M. (2012). *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(3), 745-754.

- Votýpka, J., Šeblová, V., & Rádrová, J. (2008). Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *Journal of Vector Ecology*, 33(2), 269-277.
- Wallace, F. G. (1943). Flagellate parasites of mosquitoes with special reference to *Crithidia fasciculata* Leger, 1902. *The Journal of Parasitology*, 196-205.
- Yurchenko, V., Hobza, R., Benada, O., & Lukeš, J. (1999). *Trypanosoma avium*: large minicircles in the kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology*, 92, 215-218.
- Zamora-Vilchis, I., Williams, S. E., & Johnson, C. N. (2012). Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One*, 7(6), e39208.
- Zídková, L., Čepicka, I., Szabová, J., & Svobodová, M. (2012). Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 102-112.
- Zittra, C., Vitecek, S., Obwaller, A. G., Rossiter, H., Eigner, B., Zechmeister, T., Waringer, J., & Fuehrer, H. P. (2017). Landscape structure affects distribution of potential disease vectors (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 10(1), 205.